

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA PHOSPHORYLATION DE LA MT1-MMP : UN NOUVEAU PROCESSUS
IMPLIQUÉ DANS LA PROGRESSION TUMORALE

THÈSE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOCHIMIE

PAR
CARINE INÈS NYALENDO

SEPTEMBRE 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier tout d'abord Dr. Richard Béliveau pour m'avoir intégrée au sein de son équipe du laboratoire de médecine moléculaire. Le docteur Béliveau m'a fourni un cadre de travail propice à l'apprentissage et a su me transmettre sa passion pour la science et sa rigueur scientifique. Il m'a accordé sa confiance, m'a soutenue et encouragée tout au long de mes études doctorales.

Je tiens également à remercier les membres du jury pour avoir pris le temps d'évaluer cette thèse. Merci à la Dre Claire Dubois, professeure à l'Université Sherbrooke ; aux Drs Robert Moreau et François Dragon, professeurs à l'Université du Québec à Montréal.

Je désire également remercier le Dr Denis Gingras pour son étroite collaboration à ce projet de thèse, pour la liberté et la confiance qu'il m'a accordées, pour sa disponibilité et bien entendu son sens de l'humour.

Mes remerciements vont aussi au Dr Hervé Sartelet, pathologiste au CHU Sainte-Justine, pour sa collaboration et sa disponibilité.

Mes remerciements vont également aux Drs Edith Beaulieu, Sylvie Lamy et Dominique Boivin pour leurs précieux conseils. Merci à Edith pour les bons moments passés ensemble et ses encouragements constants.

Un merci tout particulier à Yannève Rolland avec qui j'ai cheminé durant toute ma formation. Merci Yanou pour toutes nos activités scientifiques et non scientifiques, pour nos rires, nos grogues. . .

Je voudrais remercier tous les membres du laboratoire de médecine moléculaire pour avoir aggrémenté l'environnement au laboratoire. Merci à Valérie, Mathieu, Naomi, Nicolas, David, Geneviève, Éric, René, Mélanie. Je remercie particulièrement Marie et Sol pour leur précieuse aide. Je remercie également Julie Poirier, Cécile Poirier, Marie-Paule et Isabelle pour leur collaboration. Merci également aux Drs Michel Demeule, Borhane Annabi et Anthony Régina.

Merci à mes parents, qui malgré l'océan qui nous séparait, m'ont encouragé continuellement. Merci d'avoir toujours cru en moi et merci pour l'amour que vous m'avez apporté. Merci à Jean-Noël et Aurélie pour leurs encouragements.

Je ne pourrais terminer sans remercier mon époux, pour m'avoir accordé ses encouragements, son soutien moral et son amour. Merci Richard d'avoir toujours été présent dans les bons et les moins bons moments.

*À Tranquille
À mes parents
À mon époux*

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	viii
Thèse.....	viii
Article 1.....	viii
Article 2.....	ix
Article 3.....	ix
Article 4.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
Thèse.....	x
Article 3.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES.....	xi
LISTE DES SYMBOLES.....	xiii
RÉSUMÉ.....	xiv
INTRODUCTION.....	1
PREMIÈRE PARTIE	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	3
CHAPITRE I	
LA PROGRESSION Tumorale.....	4
1.1 Angiogenèse tumorale.....	5
1.1.1 Définition de l'angiogenèse.....	5
1.1.2 Morphologie des vaisseaux.....	6
1.1.3 Mécanismes de l'angiogenèse tumorale.....	6
1.2 Invasion tumorale.....	9
1.2.1 Interaction des cellules avec la MEC.....	10

1.2.2	Dégradation de la membrane basale et de la MEC.....	13
1.2.3	Migration cellulaire.....	19
1.3	Métastase.....	23
CHAPITRE II		
	LA MT1-MMP.....	25
2.1	Caractéristiques structurales de la MT1-MMP.....	25
2.2	Substrats de la MT1-MMP.....	27
2.2.1	Composants de la MEC.....	27
2.2.2	Protéines solubles.....	28
2.2.3	Protéines de surface.....	29
2.3	Régulation de la MT1-MMP.....	30
2.3.1	Régulation de l'expression génique.....	30
2.3.2	Régulation de l'activité protéolytique.....	31
2.3.3	Régulation de la localisation.....	33
2.4	Rôles de la MT1-MMP dans la progression tumorale.....	34
2.4.1	Expression de la MT1-MMP dans les tumeurs.....	34
2.4.2	Rôle dans l'angiogenèse tumorale.....	34
2.4.3	Rôle dans l'invasion tumorale.....	35
2.4.4	Rôle dans le processus de métastase.....	39
2.5	La MT1-MMP comme cible thérapeutique anti-tumorale.....	39
DEUXIÈME PARTIE		
	CONTRIBUTIONS PERSONNELLES.....	41
CHAPITRE III		
	PROJET DE RECHERCHE.....	42
3.1	Problématique.....	42
3.2	Hypothèses de travail.....	44
3.3	Objectifs de recherche.....	45
3.4	Stratégie expérimentale.....	46
3.4.1	Études <i>in vitro</i>	46
3.4.2	Études <i>in vivo</i>	48

3.4.3	Études cliniques.....	49
3.4.4	Élaboration d'un outil permettant d'inhiber la MT1-MMP phosphorylée.....	50

CHAPITRE IV

ARTICLES.....		51
4.1	Phosphorylation Src-dépendante de la MT1-MMP sur son résidu cytoplasmique tyrosine 573 : rôle dans la migration des cellules endothéliales et tumorales.....	52
	Résumé.....	52
	Acceptation des coauteurs.....	53
	Contribution de l'auteur principale et des coauteurs.....	54
	Manuscrit.....	55
4.2	L'altération de la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine réduit la prolifération des cellules tumorales dans des matrices tridimensionnelles et bloque la croissance tumorale chez la souris.....	83
	Résumé.....	83
	Acceptation des coauteurs.....	84
	Contribution de l'auteur principale et des coauteurs.....	85
	Manuscrit.....	86
4.3	Identification de la MT1-MMP phosphorylée en association avec la progression du neuroblastome.....	116
	Résumé.....	116
	Acceptation des coauteurs.....	117
	Contribution de l'auteur principale et des coauteurs.....	118
	Manuscrit.....	119
4.4	L'inhibition de la phosphorylation de la MT1-MMP bloque la progression tumorale chez la souris.....	141
	Résumé.....	141
	Acceptation des coauteurs.....	142
	Contribution de l'auteur principale et des coauteurs.....	143
	Manuscrit.....	144

CHAPITRE V	
DISCUSSION.....	165
CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES.....	177
APPENDICE A	
AUTRES CONTRIBUTIONS.....	179
BIBLIOGRAPHIE.....	180

LISTE DES FIGURES

Thèse

Figure 1.1 Structure des vaisseaux sanguins.....	7
Figure 1.2 Étapes de l'angiogenèse tumorale.....	8
Figure 1.3 Jonctions cellulaires.....	11
Figure 1.4 Structures des MMP.....	16
Figure 1.5 Régulation des MMP.....	18
Figure 1.6 Étapes de la migration mésenchymateuse 3D.....	20
Figure 1.7 Migration amiboïde 3D.....	22
Figure 1.8 Étapes du processus de métastase.....	24
Figure 2.1 Domaines structuraux de la MT1-MMP.....	26
Figure 2.2 Localisation de la MT1-MMP lors de la migration cellulaire.....	36
Figure 2.3 Activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP à la surface cellulaire.....	37
Figure 3.1 Séquence cytoplasmique de la MT1-MMP.....	45
Figure 3.2 Différents mutants de la MT1-MMP utilisés dans l'identification et la caractérisation de la phosphorylation de la MT1-MMP.....	47
Figure 3.3 Modèles de culture de cellules 2D et 3D.....	48
Figure 3.4 Modèle de croissance tumorale chez la souris.....	49
Figure 5.1 Nouvelle approche thérapeutique contre le cancer.....	176

Article 1

Figure 1 MT1-MMP is phosphorylated on its cytoplasmic tyrosine residue 573.....	78
Figure 2 Caveolin-1 and caveolae are not necessary for MT1-MMP phosphorylation.....	79
Figure 3 Generation of polyclonal phosphospecific antibodies against MT1-MMP phosphorylated on tyrosine 573.....	80
Figure 4 SIP-dependent phosphorylation of MT1-MMP in fibrosarcoma and endothelial cells.....	81

Figure 5 Mutation of cytoplasmic tyrosine 573 of MT1-MMP impairs tumor and endothelial cell migration.....	82
---	----

Article 2

Figure 1 Impairment of MT1-MMP tyrosine phosphorylation alters cell morphology of HT-1080 fibrosarcoma cells.....	110
Figure 2 Inhibition of tumor cell proliferation in 3D collagen matrices by a non phosphorylable MT1-MMP mutant.....	111
Figure 3 Cell cycle analysis of HT-1080 cells expressing wild-type MT1-MMP or Y573F mutant in 2D and 3D collagen matrices.....	112
Figure 4 Inhibition of tumor cell invasion of collagen gels by a non phosphorylable MT1-MMP.....	113
Figure 5 Inhibition of anchorage-independent growth by a non phosphorylable MT1-MMP.....	114
Figure 6 Inhibition of tumor growth by the non phosphorylable mutant of MT1-MMP.....	115

Article 3

Figure 1 Immunostaining of pMT1-MMP in NB samples.....	138
Figure 2 Inhibition of neuroblastome cell proliferation and migration by a non phosphorylable mutant of MT1-MMP.....	139
Figure 3 Localisation of tyrosine phosphorylated MT1-MMP in NB cells.....	140

Article 4

Figure 1 Inhibition of MT1-MMP phosphorylation by ACM-14.....	157
Figure 2 Reduction of tumor cell proliferation within 3D collagen matrix by ACM-14.....	158
Figure 3 ACM-14 induces apoptosis of tumor cells.....	159
Figure 4 Inhibition of tumor growth by ACM-14.....	160
Supplementary figure S1 Cellular uptake of ACM-14 and scACM-14 peptides.....	161
Supplementary figure S2	162

LISTE DES TABLEAUX

Thèse

Tableau 2.1 Diversité des substrats de la MT1-MMP.....	28
---	----

Article 3

Table 1 Clinical features of 289 patients with NB diagnosis.....	136
---	-----

Table 2 Univariate analysis of pMT1-MMP expression in clinicopathologic features.....	137
--	-----

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

2D	bidimensionnelle
3D	tridimensionnelle
ACM-14	<i>antennapedia-coupled cytoplasmic MMP-14</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	adénosine triphosphate
BAEC	<i>bovine aortic endothelial cells</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
CD44	<i>cluster of designation 44</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CE	cellules endothéliales
DMEM	<i>Dulbecco's modified essential medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleotid acid</i>
DTT	dithiotreitol
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EDTA	<i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>EGF receptor</i>
EGTA	<i>ethylene glycol tetraacetic acid</i>
EMEM	<i>Eagle's modified essential medium</i>
EMMPRIN	<i>extracellular matrix metalloproteinase inducer</i>
ERK	<i>extracellular related kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAK	<i>focal adhesion kinase</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GPI	<i>glycosyl phosphatidylinositol</i>
GST	<i>glutathion-S-transferase</i>
HEPES	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
ID	immunodétection
IEF	<i>isoelectric focusing</i>
Ig	immunoglobuline
IL-1 β	<i>interleukine 1 beta</i>
IL-2R	<i>interleukine 2 receptor</i>
IP	immunoprécipitation
FITC	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
LRP	<i>low density lipoprotein receptor-related protein</i>
MBL	<i>mannose-binding lectin</i>

MCP-3	<i>monocyte chemotactic protein-3</i>
MEC	<i>matrice extracellulaire</i>
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i>
MT1-MMP	<i>membrane-type 1 matrix metalloproteinase</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NB	<i>neuroblastome</i>
NF- κ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NS	<i>not significant</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PC6	<i>proteine convertase 6</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PECAM	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
p53	<i>protéine 53</i>
PVDF	<i>polyvinylidene difluoride</i>
pY	<i>phosphor tyrosine</i>
qPCR	<i>quantitative PCR</i>
RANKL	<i>receptor activator of NK-κB ligand</i>
RECK	<i>reversion-inducing-cysteine rich protein with Kazal motifs</i>
RNA	<i>ribonucleotide acid</i>
RNAse	<i>ribonuclease</i>
RT-PCR	<i>reverse transcription PCR</i>
scACM-14	<i>scrambled ACM-14</i>
S1P	<i>sphingosine-1-phosphate</i>
SDF-1	<i>stromal-derived factor-1</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SEM	<i>standard error of mean</i>
SH2	<i>src homology domain 2</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TMA	<i>tissue microarray</i>
TNF- α	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
tPA	<i>tissue-type plasminogen activator</i>
uPA	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VEGFR	<i>VEGF receptor</i>
z-VAD-fmk	<i>Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone</i>

LISTE DES SYMBOLES

°C	unité de température, degré Celcius
%	pourcentage
Da	Daltons
<i>g</i>	force gravitationnelle
h	unité de temps, heure
kDa	kilo Daltons
m	unité de mesure, mètre
M	unité de concentration, molaire (mole/l)
mg	unité de poids, milligramme
min	unité de temps, min
mm	unité de mesure, millimètre
mM	unité de concentration, millimolaire (mmole/l)
ml	unité de volume, millilitre
n ou N	nombre d'observations
ng	unité de poids, nanogramme
P	probabilité
SD	<i>standard deviation</i>
sec	unité de temps, seconde
µg	unité de poids, microgramme
µl	unité de volume, microlitre
µm	unité de mesure, micromètre
µM	unité de concentration, micromolaire (µmole/l)
V	volts

RÉSUMÉ

Durant la progression du cancer, les cellules tumorales doivent envahir les tissus afin de se propager dans l'organisme. Pour ce faire, elles sécrètent ou expriment à leur surface des métalloprotéases matricielles, des enzymes capables de dégrader les composants de la matrice extracellulaire. Parmi ces enzymes, la métalloprotéase matricielle de type membranaire 1 (la MT1-MMP) joue un rôle primordial dans la progression tumorale. La MT1-MMP dégrade de nombreux composants de la matrice extracellulaire et des protéines de surface. Grâce à son activité protéolytique, la MT1-MMP joue un rôle important dans les différentes étapes de la progression tumorale. En effet, la MT1-MMP est importante dans l'angiogenèse tumorale, la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux pré-existants, car elle permet aux cellules endothéliales d'envahir la matrice extracellulaire. La MT1-MMP est également impliquée dans l'invasion tumorale et la formation de métastases. Bien que l'activité protéolytique de la MT1-MMP soit importante pour ses fonctions, plusieurs études ont démontré la participation de la séquence cytoplasmique de l'enzyme dans la migration et l'invasion tumorales. Toutefois, les mécanismes par lesquels le domaine intracellulaire de la MT1-MMP contribue aux fonctions de l'enzyme n'ont pas encore été élucidés. La présente thèse avait pour objectif principal d'étudier les mécanismes menant à l'implication du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP dans la progression tumorale.

Le premier objectif des travaux de recherche présentés dans cette thèse était d'identifier et de caractériser la phosphorylation de la MT1-MMP dans sa portion cytoplasmique. Pour ce faire, nous avons utilisé la mutagenèse dirigée afin d'identifier le site de phosphorylation de la MT1-MMP. Nos résultats démontrent que la MT1-MMP est phosphorylée sur son unique résidu tyrosine 573 situé dans la portion intracellulaire de l'enzyme. Cette phosphorylation a été confirmée par l'utilisation d'anticorps reconnaissant spécifiquement les formes phosphorylées de la MT1-MMP. De plus, la phosphorylation de cette enzyme requiert la présence de la kinase Src. La stimulation des cellules tumorales avec un facteur chimioattracteur induit la phosphorylation de la MT1-MMP endogène dans les cellules tumorales et endothéliales. Nous avons également montré que la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine intracellulaire est importante pour la migration des cellules tumorales et endothéliales.

Le second objectif de cette thèse était d'étudier l'implication de la phosphorylation de la MT1-MMP dans la prolifération des cellules dans des matrices tridimensionnelles *in vitro* ainsi que dans la croissance tumorale *in vivo*. Nous avons constaté que la phosphorylation est importante pour la croissance des cellules tumorales dans des matrices tridimensionnelles alors qu'elle ne l'est pas dans des matrices en deux dimensions. Également, la phosphorylation de la MT1-MMP est nécessaire aux propriétés tumorigènes des cellules tumorales, à savoir la capacité de ces dernières à envahir de denses barrières de collagène.

fibrillaire et à former des colonies dans l'agar mou. Fait intéressant, nous avons constaté que l'inhibition de la phosphorylation de la MT1-MMP empêche la formation de xénogreffes chez la souris, suggérant que la MT1-MMP phosphorylée joue un rôle essentiel dans les mécanismes menant au développement tumoral.

Le troisième objectif de cette thèse était de vérifier si la MT1-MMP phosphorylée était nécessaire pour la progression tumorale au niveau clinique. Nous avons donc étudié des spécimens provenant de biopsies de patients atteints de neuroblastome. Nos résultats ont démontré que la MT1-MMP phosphorylée était exprimée surtout dans les cas de neuroblastome avec un mauvais pronostic, alors que les cas qui avaient un bon pronostic exprimaient peu la MT1-MMP. Ces données indiquent que la phosphorylation de la MT1-MMP pourrait jouer un rôle important dans le développement du neuroblastome.

Compte tenu du rôle majeur de la MT1-MMP phosphorylée dans la progression tumorale, le quatrième objectif de ces travaux de recherche était de concevoir une molécule pouvant inhiber la phosphorylation de la MT1-MMP afin de réduire le développement tumoral. Nous avons donc développé l'ACM-14, un peptide correspondant à la séquence cytoplasmique de la MT1-MMP dans laquelle la tyrosine a été remplacée par une phénylalanine et couplé à une séquence perméable aux cellules. Nos résultats démontrent que ACM-14 réduit la phosphorylation de la MT1-MMP et retarde par conséquent la croissance tumorale *in vivo*.

En somme, les travaux présentés dans cette thèse apportent de nouvelles informations quant à l'implication du domaine intracellulaire de la MT1-MMP dans la progression tumorale. Les résultats présentés vont contribuer au développement et à l'élaboration de nouvelles stratégies afin d'inhiber le développement du cancer.

Mots clés : cancer, invasion tumorale, MT1-MMP, phosphorylation, traitement du cancer

INTRODUCTION

Les décès reliés au cancer représentent 13% de la mortalité mondiale ; environ 10 millions de personnes découvrent chaque année qu'elles sont atteintes de cancer dans le monde et plus de 6 millions décèdent chaque année des suites de cette maladie. Durant les dernières décennies, les industries pharmaceutiques ont déployé moult efforts dans le développement de nouveaux médicaments capables de détruire les cellules cancéreuses. Malgré les progrès considérables effectués dans le traitement de certains types de cancer (leucémie, lymphomes, cancer des testicules), les formes les plus communes de cancer (cancers du poumon, du cerveau, du sein et de la prostate, par exemple) sont encore trop souvent résistantes aux traitements conventionnels de chimiothérapie. La compréhension des mécanismes régissant le développement du cancer revêt donc une importance capitale pour la découverte de nouveaux médicaments plus efficaces à enrayer ou à retarder significativement la progression tumorale.

La métalloprotéase matricielle de type membranaire 1 (MT1-MMP) est une enzyme très étudiée à cause de son implication dans les différents processus de la progression tumorale. Bien qu'il soit reconnu que l'activité enzymatique de la MT1-MMP soit nécessaire pour son implication dans la progression tumorale, sa portion intracellulaire participe également à ces événements, mais les mécanismes de cette contribution sont peu connus. La présente thèse vise à étudier le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP et son implication dans la progression tumorale. Pour ce faire, nous avons utilisé différentes stratégies expérimentales faisant intervenir des techniques *in vitro* et *in vivo*, et des études cliniques utilisant des biopsies provenant de patients atteints de cancer.

La présente thèse se divise en deux parties : la première présente l'état des connaissances actuelles, et la deuxième les contributions personnelles de l'auteure de la thèse. Dans cette deuxième partie, le premier chapitre est consacré à la présentation du projet

de recherche alors que le deuxième chapitre présente les résultats des travaux de recherches sous forme d'articles publiés ou soumis dans des journaux scientifiques. Le troisième chapitre de la deuxième partie présente une discussion générale de la thèse.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTAT DES CONNAISSANCES

CHAPITRE I

LA PROGRESSION TUMORALE

Le développement du cancer est un phénomène extrêmement complexe qui se déroule en plusieurs étapes. Cette pathologie survient lorsque la cellule normale subit des modifications génétiques (Ilyas *et al.*, 1999) de façon spontanée ou suite à des événements accidentels et rares, tels que la présence d'agents génotoxiques, de radiations ou de virus (Colditz, Sellers et Trapido, 2006). La cellule acquiert alors des caractéristiques tumorales, en un procédé impliquant plusieurs transformations successives provenant d'altérations génétiques importantes (Hanahan et Weinberg, 2000). D'abord, la cellule développe une autosuffisance face aux facteurs de croissance, devient insensible aux signaux d'arrêt de croissance, échappe au processus de mort par apoptose et parvient à se répliquer indéfiniment. Il en résulte une masse tumorale composée de cellules transformées qui se multiplient de façon anarchique (Hanahan et Weinberg, 2000). À cette étape, d'une part, la tumeur peut croître relativement lentement et rester localisée à son site d'origine sans être néfaste pour l'organisme : elle est alors dite bénigne. D'autre part, la tumeur peut subir d'autres transformations additionnelles, devenir maligne et évoluer en cancer par un processus appelé progression tumorale. Ce processus implique la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules tumorales afin de promouvoir la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants, par un phénomène nommé angiogenèse tumorale. Le nouveau réseau vasculaire ainsi formé, reliant la masse tumorale au système vasculaire de l'organisme, permet à la tumeur de s'alimenter en nutriments et en oxygène, et par conséquent de se développer (Folkman, 1995). Certaines cellules tumorales acquièrent ensuite la capacité d'envahir les tissus et de se propager dans l'organisme par un processus

appelé métastase, ce dernier étant responsable de 90% des décès reliés au cancer (Yilmaz, Christofori et Lehembre, 2007). Dans les paragraphes suivants, les principales étapes de la progression tumorale sont décrites.

1.1 Angiogenèse tumorale

1.1.1 Définition de l'angiogenèse

Afin de fonctionner normalement et de survivre, les tissus ont besoin d'un apport continu en oxygène et en nutriments provenant du réseau vasculaire. Pour cette raison, toutes les cellules de l'organisme sont situées à environ 100 à 200 μm des capillaires sanguins, distance à laquelle l'oxygène peut diffuser vers les tissus (Tonini, Rossi et Claudio, 2003). Par conséquent, si aucun nouveau capillaire n'est formé, la croissance des tissus est limitée à quelques millimètres cubes. L'angiogenèse, soit la formation de nouveaux capillaires à partir de vaisseaux préexistants, est un phénomène assez rare chez l'adulte (Hobson et Denekamp, 1984). Néanmoins, l'angiogenèse est impliquée dans plusieurs processus physiologiques incluant le développement embryonnaire (Pepper *et al.*, 2000), le renouvellement des tissus du système de reproduction de la femme (Hyder et Stancel, 1999) et la cicatrisation (Tonnesen, Feng et Clark, 2000). Dans ces conditions, l'angiogenèse est très contrôlée et ne dure qu'une courte période de temps avant d'être complètement inhibée. Toutefois, le dérèglement des mécanismes qui régissent le contrôle de l'angiogenèse soutient le développement de plusieurs pathologies telles que le cancer (Folkman, 1995), la rétinopathie diabétique (Ferrara et Alitalo, 1999) et l'arthrite rhumatoïde (Koch, 1998). En effet, ces pathologies détournent à leur profit le processus d'angiogenèse.

1.1.2 Morphologie des vaisseaux sanguins

Chez l'adulte, les vaisseaux sanguins occupent une surface supérieure à 1000 m². En plus de former une barrière physiologique statique, ils possèdent des fonctions de synthèse, sécrétrices, métaboliques et immunologiques. Les vaisseaux sanguins sont formés d'une seule couche de cellules spécialisées, les cellules endothéliales, qui forment l'endothélium vasculaire et sont en contact direct avec le flux sanguin. L'endothélium réside sur une membrane basale composée de protéines de la matrice extracellulaire, formant ensemble la tunique interne des vaisseaux sanguins (voir Figure 1.1). Cette tunique interne est entourée de cellules murales, comprenant essentiellement des péricytes, de cellules musculaires lisses ou de cardiomyocytes, formant ainsi la tunique moyenne. Les péricytes, recrutés par les cellules endothéliales durant la vasculogénèse, i.e. la néo-formation de vaisseaux sanguins, jouent un rôle important dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux, en stoppant le renouvellement des cellules endothéliales. Lors de la néovascularisation, les péricytes sont sélectivement éliminés des vaisseaux angiogéniques (Griffioen et Molema, 2000 ; Tortora et Grabowski, 2002).

1.1.3 Mécanismes de l'angiogénèse tumorale

Il est bien établi que la croissance des tumeurs solides dépend du processus d'angiogénèse (Folkman, 1971, 1990). Le développement tumoral débute par une phase pré-vasculaire, durant laquelle la tumeur croît jusqu'à une taille d'environ 1 à 2 mm³ et reste en dormance. Dans cet état, la tumeur subsiste grâce à un équilibre entre prolifération et régression. Afin de croître davantage, les cellules tumorales sécrètent des molécules angiogéniques promouvant la vascularisation de la tumeur. Cette transition de la tumeur de l'état de dormance à l'état vascularisé est appelée *switch angiogénique* (Hanahan et Folkman, 1996).

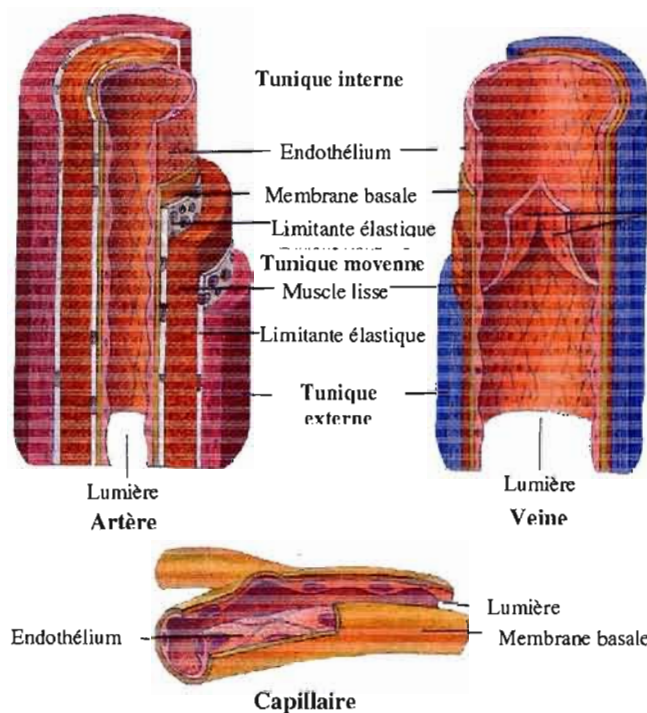


Figure 1.1 Structure des vaisseaux sanguins. Il existe trois différents types de vaisseaux sanguins : les capillaires qui sont les plus simples (tunique interne) et les plus petits (8 à 10 μm), les artères et les veines, ces dernières possédant en plus une tunique moyenne et une tunique externe. Illustration tirée et modifiée de (Tortora et Grabowski, 2002).

L'angiogenèse tumorale est un processus dynamique et complexe durant lequel les cellules tumorales produisent et sécrètent des facteurs angiogéniques, permettant ainsi aux cellules endothéliales de proliférer, de produire des molécules capables de dégrader la matrice extracellulaire, de changer leurs propriétés d'adhésion, de migrer, d'échapper à la mort par apoptose et finalement de se différencier en nouveaux vaisseaux (voir Figure 1.2) (Munoz-Chapuli, Quesada et Angel Medina, 2004).

Lors du *switch angiogénique*, les cellules tumorales augmentent leur capacité de produire des molécules angiogéniques. Par exemple, la majorité des tumeurs augmentent

l'expression du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) ainsi que des facteurs de croissance des fibroblastes (FGF). Par contre, certaines tumeurs diminuent l'expression d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, tels que la thrombospondine-1 ou l'interféron- β (Hanahan et Weinberg, 2000). Suite à leur sécrétion par les cellules tumorales, les molécules angiogéniques activent les cellules endothéliales (CE) via leurs récepteurs de surface. L'activation des CE entraîne leur prolifération ainsi que l'expression de protéases, incluant les métalloprotéases matricielles (MMP) et les activateurs du plasminogène, provoquant ainsi la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. La dissolution de la matrice extracellulaire permet également de libérer les molécules angiogéniques qui y sont emprisonnées (Bhushan *et al.*, 2002).

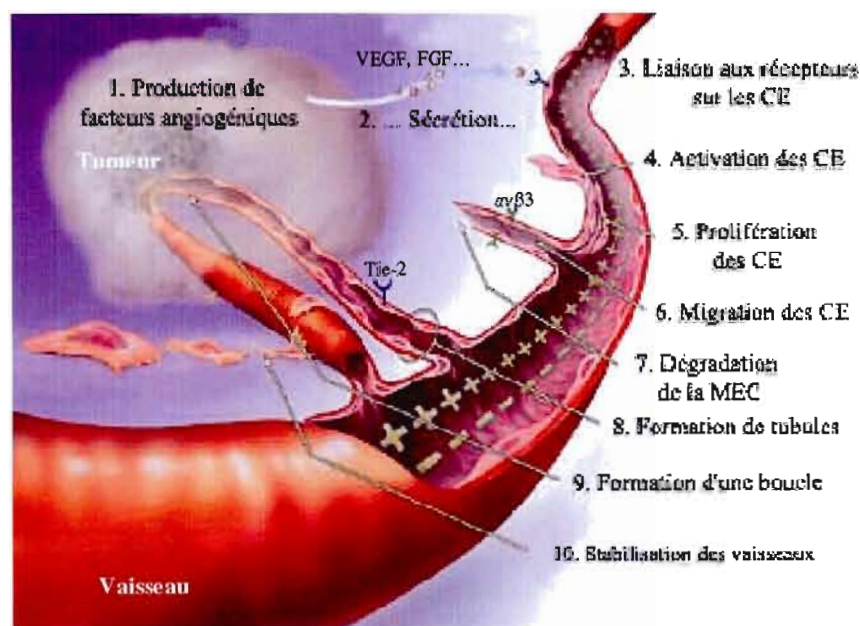


Figure 1.2 Étapes de l'angiogenèse tumorale. L'angiogenèse tumorale implique la production (1) et la sécrétion (2) de facteurs angiogéniques par les cellules tumorales. Suite à l'activation des cellules endothéliales (CE) par les facteurs angiogéniques (3, 4), ces dernières prolifèrent et forment de nouveaux vaisseaux afin d'alimenter la tumeur (5, 6, 7, 8, 9 et 10). Illustration tirée du site web de l'Angiogenesis Foundation (<http://www.angio.org>).

Les MMP altèrent également les jonctions entre les cellules endothéliales, permettant aux projections cellulaires (bourgeonnements) de passer à travers les espaces ainsi créés. Ces bourgeonnements des vaisseaux formés *de novo* s'accroissent en direction de la tumeur, la source de leurs stimuli. Les cellules endothéliales envahissent la matrice extracellulaire et commencent à migrer et à proliférer à l'intérieur de la masse tumorale, où elles s'organisent en tubules (canalisation) et créent une nouvelle membrane basale afin d'établir une stabilité vasculaire. La formation de la lumière du vaisseau durant la canalisation est possible grâce aux interactions entre les protéines de surface et les composants de la matrice extracellulaire. Les protéines impliquées dans ces interactions incluent la cadhérine VE et la PECAM-1 (Tonini, Rossi et Claudio, 2003).

Le nouveau réseau vasculaire permet à la tumeur, non seulement de s'alimenter et de se débarrasser de ses déchets, mais aussi de détruire et envahir les tissus avoisinant par un processus appelé invasion tumorale.

1.2 Invasion tumorale

Afin de se répandre dans l'organisme, les cellules tumorales doivent s'infiltrer dans les tissus environnants, les détruire et les coloniser. Cette invasion des tissus par les cellules tumorales se caractérise par trois étapes distinctes, soit la diminution de l'interaction des cellules tumorales avec la matrice extracellulaire (MEC), la dégradation de cette dernière et la migration des cellules tumorales. Chacune de ces étapes est régie par plusieurs interactions moléculaires spécifiques entre les cellules tumorales et la MEC environnante et les cellules du stroma. Les paragraphes qui suivent décrivent chacune des étapes impliquées dans le processus d'invasion tumorale.

1.2.1 Interaction des cellules avec la MEC

Chez les organismes multicellulaires, les tissus possèdent une organisation tridimensionnelle (3D) permettant aux cellules d'accomplir les fonctions tissulaires complexes. Afin d'adopter et de maintenir leur organisation 3D, les tissus baignent dans un réseau extracellulaire complexe de protéines et de protéoglycanes (la MEC), permettant aux cellules d'adhérer, de se mouvoir, de proliférer et de subir des changements morphologiques (Lin et Bissell, 1993). Au début du processus d'invasion tumorale, les cellules tumorales subissent plusieurs transformations conduisant à une diminution des contacts intercellulaires et des interactions entre les cellules et la MEC.

1.2.1.1 Perte des jonctions intercellulaires

Dans un tissu normal, les cellules sont reliées entre elles par des structures protéiques appelées jonctions intercellulaires. Ces structures permettent aux cellules de communiquer entre elles et contribuent au maintien de l'organisation 3D des tissus. Il existe trois types de jonctions intercellulaires ; les jonctions étanches (serrées), les jonctions d'ancrage (desmosomes et hémidesmosomes) et les jonctions communicantes (gap) (voir Figure 1.3). Chaque jonction est constituée d'un composant du cytosquelette relié à une protéine transmembranaire par une molécule de liaison, et nécessite un ligand externe. Les protéines transmembranaires sont des molécules d'adhésion qui comprennent plusieurs types de protéines : les cadhérines, les intégrines, la superfamille des immunoglobulines (Ig), les sélectines, les connexines, les occludines et les claudines (Bock, 1991).

Les cadhérines représentent la plus importante superfamille de molécules d'adhésion. L'expression de la cadhérine E, la molécule d'adhésion la plus abondante dans les jonctions d'ancrage de l'épithélium, est diminuée dans la majorité des cancers d'origine épithéliale. Cette baisse d'expression est déterminante pour le processus d'invasion tumorale, puisque

plusieurs équipes de recherche ont démontré que la surexpression de la cadhérine E supprime le phénotype invasif de plusieurs types de cellules tumorales (Frixen *et al.*, 1991 ; Hsu *et al.*, 2000 ; Luo, Lubaroff et Hendrix, 1999 ; Vleminckx *et al.*, 1991).

La cadhérine E forme un complexe moléculaire avec les caténines, des molécules de liaison cytoplasmiques reliant la cadhérine E au cytosquelette d'actine, cette interaction étant importante pour une adhésion intercellulaire solide. Plusieurs études ont démontré que la baisse d'expression de la caténine β , et par conséquent l'instabilité des complexes d'adhésion intercellulaire, constitue un facteur favorisant l'invasion tumorale (Bremnes *et al.*, 2002).

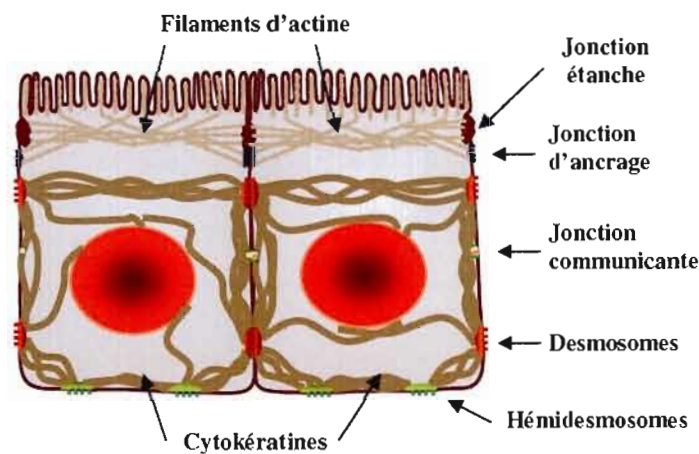


Figure 1.3 Les jonctions intercellulaires. Les jonctions étanches empêchent l'échange de matériel à travers la membrane. Les jonctions d'ancrage (incluant les desmosomes) permettent aux cellules d'adhérer entre-elles. Le transfert de matériel d'une cellule à l'autre s'effectue à travers les jonctions communicantes.

1.2.1.2 Modification de l'adhésion des cellules à la MEC

La MEC est un assemblage de différents types de macromolécules : les protéines de structure (collagènes et élastine), les protéines d'adhésion et les polysaccharides (glycosaminoglycanes et protéoglycanes). La famille des collagènes, qui compte une vingtaine de membres, est la composante majeure de la MEC et joue un rôle de soutien et de résistance mécanique. Le collagène peut être fibrillaire (par exemple le collagène de type I qui représente 90% de tous les collagènes), ou non fibrillaire (le collagène de type IV) (Prockop et Kivirikko, 1995). L'élastine est un autre composant fibrillaire de la MEC qui confère une élasticité aux artères, aux muscles, aux poumons, au cœur et à la peau. Parmi les protéines d'adhésion de la MEC se trouvent la laminine, la vitronectine, la fibronectine et la tenascine (Ekblom, 1996). La membrane basale, une structure spécialisée de la MEC constituée à 80% de laminine, joue un rôle d'interface entre la MEC et les épithélium et endothélium.

Afin d'adhérer à la MEC, les cellules possèdent à leur surface des récepteurs transmembranaires des molécules d'adhésion de la MEC. Ces récepteurs, les intégrines, non seulement permettent aux cellules d'adhérer à la MEC, mais jouent également le rôle de transducteurs de signaux provenant de la MEC vers l'intérieur de la cellule. Les intégrines sont des hétérodimères constitués de sous unités α et β , celles-ci pouvant former jusqu'à 25 combinaisons différentes, chaque combinaison pouvant reconnaître spécifiquement un groupe de molécules d'adhésion de la MEC. Par exemple, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ se lie à une grande variété de molécules, incluant la fibronectine, le fibrinogène, le facteur de von Willbrand, la vitronectine, les formes dégradées de collagène et de laminine, alors que l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ se lie sélectivement à la fibronectine 5. Les intégrines jouent un rôle important dans l'invasion cellulaire, en promouvant l'adhésion des cellules à la MEC, en régulant les voies de signalisation intracellulaires qui contrôlent l'organisation du cytosquelette et la survie, et également en prévenant l'apoptose (Hood et Cheresch, 2002).

Durant l'invasion tumorale, les cellules cancéreuses subissent des changements importants au niveau de l'expression des intégrines à la surface cellulaire et au niveau de l'affinité des intégrines à la MEC. Par exemple, les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_2\beta_1$ et $\alpha_4\beta_1$ sont fortement exprimées aux fronts d'invasion des cellules de mélanome malin, alors qu'elles sont très peu exprimées par les cellules de mélanomes pré-néoplasiques (non invasifs) (Brooks, Clark et Cheresh, 1994 ; Seftor, Seftor et Hendrix, 1999). De plus, l'induction de l'expression des sous unités α_v ou β_3 dans des cellules de mélanome augmente leur potentiel métastatique (Felding-Habermann *et al.*, 1992 ; Filardo *et al.*, 1995). De la même façon, l'expression de l'intégrine $\alpha_6\beta_4$ est augmentée durant la progression du carcinome de la thyroïde (Serini *et al.*, 1996), ou des papillomes (Tennenbaum *et al.*, 1993). Par contre, l'expression de certaines intégrines est diminuée durant l'invasion tumorale. C'est le cas des sous unités α_1 , α_6 , β_1 et β_4 dans le cancer du sein (Mizejewski, 1999).

1.2.2 *Dégradation de la membrane basale et de la MEC*

Durant la progression tumorale, en plus des changements importants au niveau des interactions intercellulaires et entre les cellules et la MEC, les cellules tumorales augmentent leur potentiel à induire la protéolyse de la membrane basale et de la MEC. Pour ce faire, elles produisent en grande quantité de nombreuses protéases extracellulaires dont les cibles sont les protéines de la MEC, les molécules d'adhésion et les protéines à la surface cellulaire. Trois grandes familles de protéases sont impliquées dans la dégradation de la MEC : les cathepsines, les activateurs du plasminogène et les métalloprotéases matricielles.

1.2.2.1 *Les cathepsines*

Les cathepsines sont une famille de 11 endopeptidases localisées généralement dans les endolysosomes. Certaines cathepsines spécifiques ont des fonctions extracellulaires ; c'est le cas de la cathepsine K qui est sécrétée par les ostéoclastes, et qui joue un rôle dans le

remodelage osseux. L'expression des cathepsines est augmentée dans la majorité des cancers. Durant la progression tumorale, elles peuvent être intracellulaires, sécrétées ou associées à la surface cellulaire, contribuant ainsi à la dégradation de la MEC. Plusieurs études impliquant l'utilisation de modèles de souris transgéniques ont confirmé le rôle des cathepsines dans la croissance et l'invasion tumorale (Mohamed et Sloane, 2006). Lorsque sécrétées, les cathepsines vont cliver certaines protéines de la MEC telles que la laminine (Buck *et al.*, 1992 ; Ishidoh et Kominami, 1995), le collagène de type IV (Buck *et al.*, 1992) et la tenascine C (Mai *et al.*, 2002). Les cathepsines clivent également des protéines impliquées dans l'adhésion des cellules avec la MEC, telles que la cadhérine E (Gocheva *et al.*, 2006).

1.2.2.2 Les activateurs du plasminogène

L'activation du plasminogène joue un rôle important dans l'invasion tumorale et le processus de métastase. En effet, les activateurs du plasminogène sécrétés par les cellules cancéreuses transforment le plasminogène inactif en sa forme active, la plasmine, qui à son tour dégrade la majorité des composants de la MEC et de la membrane basale, facilitant ainsi l'invasion des tissus par les cellules tumorales. Il existe deux types d'activateurs du plasminogène : le type urokinase (*urokinase-type plasminogen activator*, uPA) qui est principalement associé aux tumeurs, et le type tissulaire (*tissue-type plasminogen activator*, tPA) qui joue un rôle clé dans le système de coagulation (Andreasen, Egelund et Petersen, 2000).

1.2.2.3 Les métalloprotéases matricielles

Les métalloprotéases matricielles (MMP) représentent une grande famille d'endopeptidases dépendantes du zinc qui, collectivement, dégradent tous les composants de la MEC (Chambers et Matrisian, 1997 ; Curran et Murray, 1999). Le premier membre de la famille des MMP, une collagénase maintenant connue sous le nom de MMP-1, a été identifié

en 1962 par Gross et Lapière (Gross et Lapiere, 1962). À ce jour, il existe 25 différentes MMPs identifiées chez l'humain. La dégradation de MEC joue un rôle important dans plusieurs conditions physiologiques normales, entre autres durant le développement, la reproduction et le maintien de l'homéostasie, mais également dans diverses pathologies impliquant la destruction des tissus (par exemple le cancer et l'arthrite rhumatoïde) et les maladies cardiovasculaires (Nagase et Woessner, 1999). Dans le cancer et les autres pathologies, l'expression des MMP est fortement augmentée et est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de cancer (Egeblad et Werb, 2002).

Les membres de la famille des MMP peuvent être sécrétés ou ancrés à la membrane plasmique. Les MMPs peuvent être divisées en huit groupes structuraux distincts (voir Figure 1.4). Bien que la composition soit différente d'un groupe à l'autre, les MMPs possèdent toutes une structure de base dans laquelle on retrouve un domaine catalytique possédant un motif HEXGH qui chélate les atomes de zinc, un pré-domaine situé en N-terminal qui les dirige vers le réticulum endoplasmique, ainsi qu'un pro-domaine qui les maintient sous forme latente. Certaines MMPs, les matrilysines MMP-7 et MMP-27, ne possèdent que cette structure de base. En plus de la structure de base, toutes les autres MMPs possèdent un domaine hémapexine, relié au domaine catalytique par une région charnière, qui est responsable des interactions avec leurs inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMPs), les molécules de surface et les substrat protéolytiques. D'autres domaines spécialisés sont également retrouvés dans certaines MMPs (voir Figure 1.4). Les métalloprotéases ancrées à la membrane sont soit transmembranaires avec un court domaine cytoplasmique, soit associées à la membrane par une ancre glycosyl phosphatidylinositol (GPI), ou encore par un signal d'ancrage en N-terminal (Egeblad et Werb, 2002).

Les fonctions des MMP sont multiples et reflètent leur importance dans la progression tumorale. Une des fonctions des MMP est l'activation des proMMP. Par exemple, la proMMP-2 peut être activée par la MMP-14 (MT1-MMP) (Strongin *et al.*, 1995) ou la MMP-15 (Morrison *et al.*, 2001). Afin de créer un espace extracellulaire propice à la migration cellulaire, les MMPs dégradent tous les composants structurels de la matrice

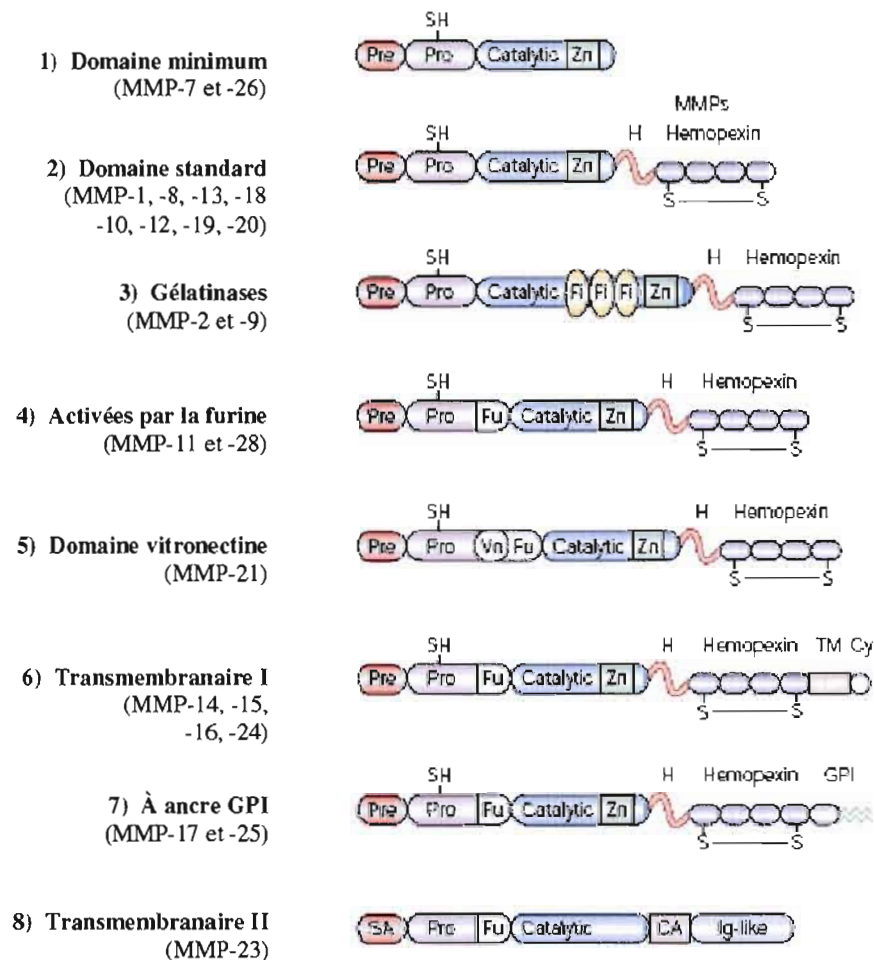


Figure 1.4 Les structures des MMP. Pre, Pré-domaine ; Pro, Pro-domaine ; SA, signal d'ancrage ; Catalytic, domaine catalytique ; Zn, atome de zinc ; H, domaine charnière, Hemopexin, domaine semblable à l'hémopexine, Fi, domaine semblable au site de liaison de la fibronectine ; Fu, site de reconnaissance de la furine ; Vn, domaine semblable à la vitronectine ; TM, domaine transmembranaire ; Cy, domaine cytoplasmique, GPI, ancre glycosyl phosphatidylinositol ; Ig-like, domaine semblable aux immunoglobulines.

Illustration tirée et modifiée de (Egeblad et Werb, 2002).

extracellulaire. Toutefois, la dégradation de la MEC par les MMP produit des effets bien plus complexes qu'uniquement la promotion de la migration cellulaire. En plus des protéines et protéoglycanes structuraux qui la composent, la matrice extracellulaire est un réservoir de facteurs de croissance, tels que le facteur de croissance transformant TGF- β , le facteur de croissance des fibroblastes 1 FGF-1, le facteur de nécrose tumorale TNF- α (Somerville, Oblander et Apte, 2003), ces derniers étant emprisonnés dans un réseau complexe et dense de la matrice interstitielle. Ainsi, le clivage des protéines de la MEC par les MMP entraîne le relargage des facteurs de croissance qui y sont emprisonnés, promouvant ainsi la croissance des cellules tumorales. Les MMP sont également impliquées dans le clivage des protéines présentes dans les jonctions d'ancrage. Par exemple, la MMP-3 et la MMP-7 peuvent cliver la cadhérine E, contribuant ainsi au processus d'invasion tumorale en détruisant l'agrégation des cellules (Noe *et al.*, 2001 ; Steinhausen *et al.*, 2001).

Chez l'humain, le système immunitaire est capable de reconnaître et d'attaquer les cellules cancéreuses en provoquant des réactions inflammatoires (Coussens et Werb, 2001). Toutefois, les cellules cancéreuses ont développé des mécanismes leur permettant d'échapper à la surveillance immunitaire, et les MMP y sont impliquées. Les lymphocytes T font partie des cellules immunitaires qui s'infiltrent dans les tumeurs. Leur prolifération est régulée par la signalisation intracellulaire induite par les cytokines via le récepteur de l'interleukine-2 (IL-2R) situé à la surface des lymphocytes T. La MMP-9, et d'autres MMP, peuvent cliver le récepteur IL-2R, empêchant par le fait même la prolifération des lymphocytes (Sheu *et al.*, 2001).

Dans les tumeurs, la protéolyse extracellulaire induite par les MMP est finement contrôlée à plusieurs niveaux (Figure 1.5). Contrairement aux oncogènes classiques, les MMP ne sont pas régulées par amplification génique ou par des mutations, à l'exception des gènes *MMP-23* et *MMP-24* dans le neuroblastome (Gururajan *et al.*, 1998 ; Llano *et al.*, 1999) ; elles sont plutôt régulées au niveau transcriptionnel. Par exemple, la transcription des gènes *MMP-1* et *MMP-13* est réprimée par p53, un suppresseur de tumeurs (Sun *et al.*, 2000 ; Sun *et al.*, 1999).

Les MMP sont également régulées au niveau de la traduction de l'ARNm et de la sécrétion à l'extérieur de la cellule. Dans le milieu extracellulaire, la protéolyse induite par les MMP peut être régulée par l'activation des pro-MMPs. Les MMP actives peuvent être inhibées par leurs inhibiteurs tissulaires (TIMP), ou encore dégradées. La protéolyse péricellulaire induite par les MMPs transmembranaires (MT-MMP) peut être quant à elle régulée par l'internalisation et le recyclage des enzymes à la surface cellulaire (Egeblad et Werb, 2002).

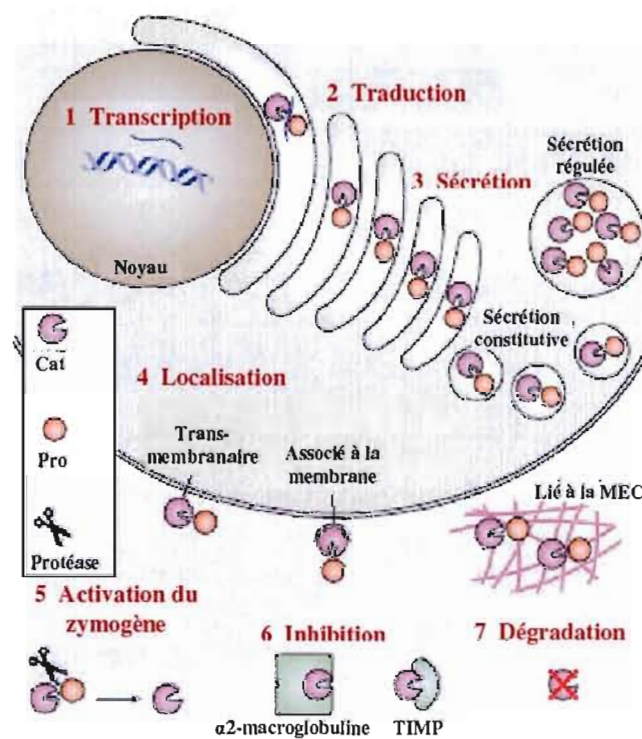


Figure 1.5 La régulation des MMP. La régulation de la protéolyse induite par les MMP s'effectue à sept différents niveaux. Notons que les MT-MMP peuvent être régulées également par internalisation et recyclage à la membrane. Cat, domaine catalytique des MMP ; Pro, Pro-domaine des MMP. Illustration tirée et modifiée de (Page-McCaw, Ewald et Werb, 2007)

1.2.3 Migration cellulaire

La migration cellulaire est un processus complexe et très coordonné durant lequel la cellule modifie sa forme et sa rigidité afin d'interagir avec la MEC, qui lui fournit non seulement des substrats, mais qui représente également une barrière 3D que la cellule doit franchir. La cellule tumorale peut migrer *seule*, ou *en groupe* avec d'autres cellules. Dans le premier cas, la migration peut se dérouler de deux façons différentes : la migration de type mésenchymateuse et la migration de type amiboïde.

1.2.3.1 Migration mésenchymateuse

La migration mésenchymateuse est utilisée principalement par les cellules provenant de tumeurs des tissus conjonctifs, tels que les fibrosarcomes (Wolf *et al.*, 2003), les gliomes (Paulus *et al.*, 1996) et certains cancers épithéliaux (Polette *et al.*, 1998 ; Tester *et al.*, 2000). Les cellules adoptent alors une morphologie allongée caractéristique des fibroblastes ; elles sont très invasives et interagissent avec les cellules du stroma tumoral (Lee *et al.*, 2006). La migration mésenchymateuse nécessite la présence des intégrines ainsi que des protéases (MMP et activateurs du plasminogène). Afin d'amorcer la migration mésenchymateuse, la cellule se polarise et s'allonge. Ensuite, la migration cellulaire s'effectue en cinq principales étapes (voir Figure 1.6).

Étape 1 – Formation de pseudopodes. Initialement, la cellule forme des protusions de la membrane cellulaire appelés pseudopodes, au niveau du front de migration. La formation des pseudopodes est possible grâce à la polymérisation de l'actine et son assemblage en filaments (Cramer, 1999 ; Rohatgi *et al.*, 1999). La polymérisation de l'actine est un procédé très dynamique faisant intervenir l'activité des petites protéines G, incluant les GTPases RAC, CDC42, RHO et RAS (Kaibuchi, Kuroda et Amano, 1999). À cette étape, l'adhésion à la MEC via les intégrines n'est pas nécessaire.

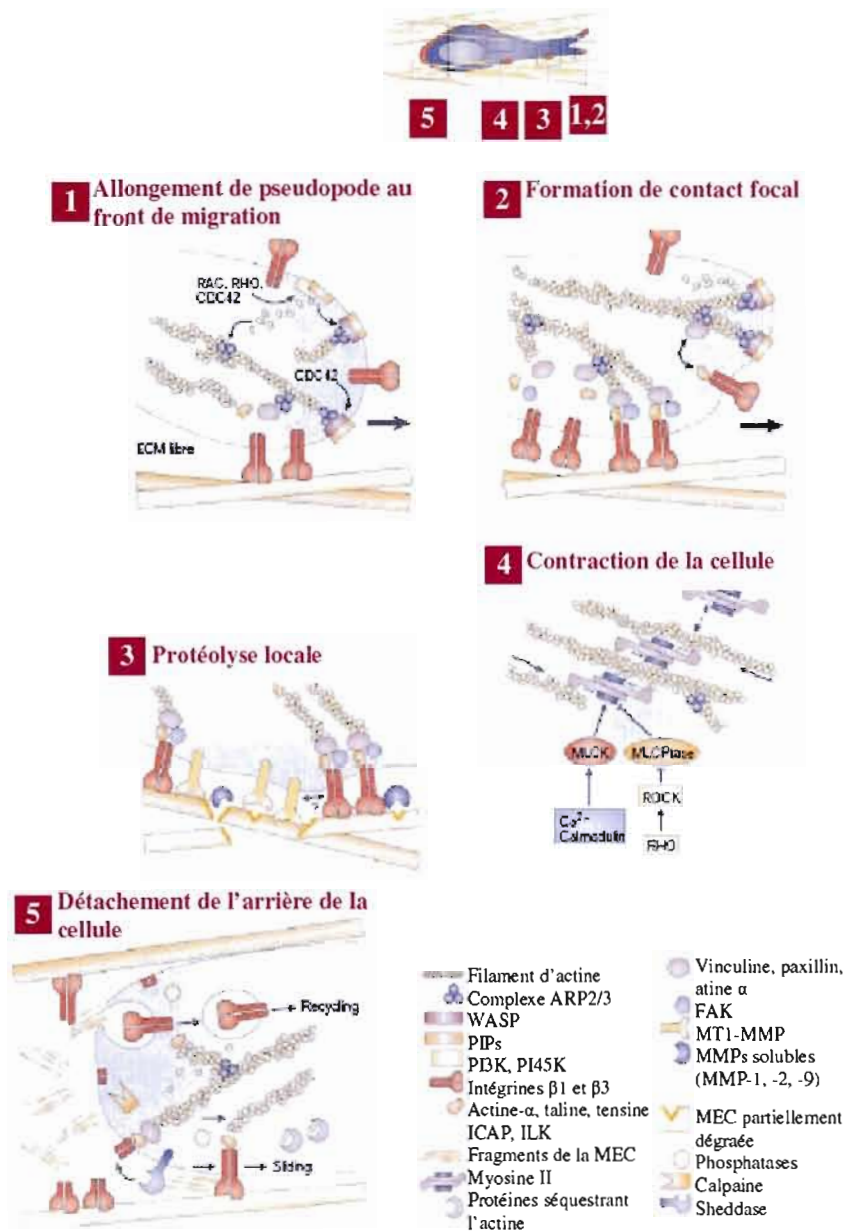


Figure 1.6 Étapes de la migration mésenchymateuse 3D. La migration mésenchymateuse s'effectue en cinq étapes différentes. Illustration tirée et modifiée de (Friedl et Wolf, 2003).

Étape 2 – Formation de contact focaux. La croissance des pseudopodes entraîne l'interaction subséquente de la cellule avec la MEC via, dans la majorité des cas, les intégrines (Hynes, 2002) et l'agglomération de ces dernières à la membrane plasmique. Par le recrutement de protéines adaptatrices, les intégrines se couplent au cytosquelette d'actine, afin de former ces structures enrichies localement : les points de contacts focaux.

Étape 3 – Protéolyse locale. La formation de complexes d'adhésion focale lors de l'étape précédente entraîne le recrutement de protéases de surface qui protéolysent la MEC. La protéase majeure impliquée dans la protéolyse péricellulaire est la MMP transmembranaire 1 (MT1-MMP) (voir Chapitre II). La MT1-MMP clive aussi bien les composants de la MEC, tels que la fibronectine, le collagène et les laminines, que les proMMP, tels que la proMMP-2 (Ohuchi *et al.*, 1997).

Étape 4 – Contraction de la cellule. Pendant la formation de complexes d'adhésion focaux et la dégradation péricellulaire de la MEC, la myosine se lie aux filaments d'actine, formant ainsi l'actomyosine, qui en se contractant, entraîne subséquemment la contraction de la cellule (Cramer, 1999 ; Katoh *et al.*, 2001 ; Verkhovsky, Svitkina et Borisy, 1995). La contraction de l'actomyosine s'effectue grâce au concours de la petite protéine G RHO et de son effecteur en aval ROCK (Kaibuchi, Kuroda et Amano, 1999).

Étape 5 – Détachement de l'arrière de la cellule. A l'arrière de la cellule, les contacts focaux se désassemblent provoquant ainsi le détachement de l'arrière de la cellule, alors que les protusions situées à l'avant restent adhérentes et s'allongent. Ce processus implique entre autres l'internalisation des intégrines puis leur recyclage au niveau des protusions à l'avant de la cellule (Ballestrem *et al.*, 2001 ; Bretscher, 1996). Ensuite, la cellule glisse lentement vers l'avant, pendant que les étapes 1 à 4 se poursuivent en boucle (Regen et Horwitz, 1992 ; Smilenov *et al.*, 1999).

1.2.3.1 Migration amiboïde

La migration amiboïde est une stratégie utilisée par les cancers des cellules hématopoïétiques (leucémies et lymphomes) (Friedl, Borgmann et Brocker, 2001), les adénocarcinomes du sein (Farina *et al.*, 1998) et le carcinome du poumon à petites cellules (Condeelis, Jones et Segall, 1992). Ce type de migration diffère de la migration mésenchymateuse en plusieurs points. D'une part, la cellule adopte une morphologie plutôt arrondie et déformée (Figure 1.7), interagit très peu avec le stroma et ne nécessite pas la dégradation de la matrice extracellulaire par les protéases. Plutôt que de créer un espace en dégradant la MEC comme c'est le cas dans la migration mésenchymateuse, la cellule qui migre de façon amiboïde se faufile entre les fibres de la MEC. Ce mouvement est généré par l'actine corticale filamenteuse, alors que les contacts focaux, les fibres de stress ainsi que la protéolyse péricellulaire sont absentes (Friedl et Wolf, 2003)

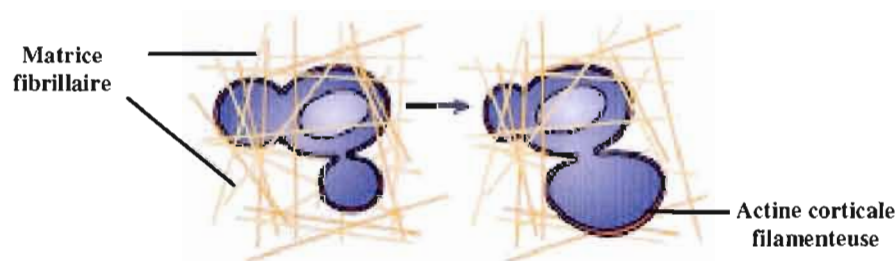


Figure 1.7 La migration amiboïde 3D. Lors de la migration amiboïde, la cellule se faufile entre les fibres qui composent la MEC 3D. Illustration tirée et modifiée de (Friedl et Wolf, 2003).

1.3 Métastase

De façon générale, les patients qui reçoivent un diagnostic de cancer possèdent déjà des métastases, si bien qu'il est trop tard pour des stratégies thérapeutiques locales. Malheureusement pour le patient, la présence de métastases réduit considérablement le succès des traitements utilisant les stratégies thérapeutiques conventionnelles (chirurgie, chimiothérapie et radiothérapie) (Astrow, 1994). En fait, 90% des décès reliés aux tumeurs solides sont causés par les métastases (Sporn, 1996).

Le phénomène de métastase est un processus à plusieurs étapes impliquant l'invasion, l'intravasation, la circulation dans les vaisseaux sanguins ou lymphatiques, l'extravasation et la croissance des cellules tumorales dans un nouvel organe (voir Figure 1.8) (Chambers, Groom et MacDonald, 2002). L'invasion tumorale et le processus de métastase sont étroitement liés et impliquent les mêmes acteurs, soit les molécules adhésions intercellulaires (les immunoglobulines et les cadhérines), les molécules d'interaction entre les cellules et la MEC (les intégrines) de même que les métalloprotéases matricielles (MMP) (Hanahan et Weinberg, 2000). Parmi ces MMP, la MT1-MMP (MMP-14), qui joue un rôle fondamental dans toutes les étapes de la progression tumorale, sera l'objet du chapitre suivant.

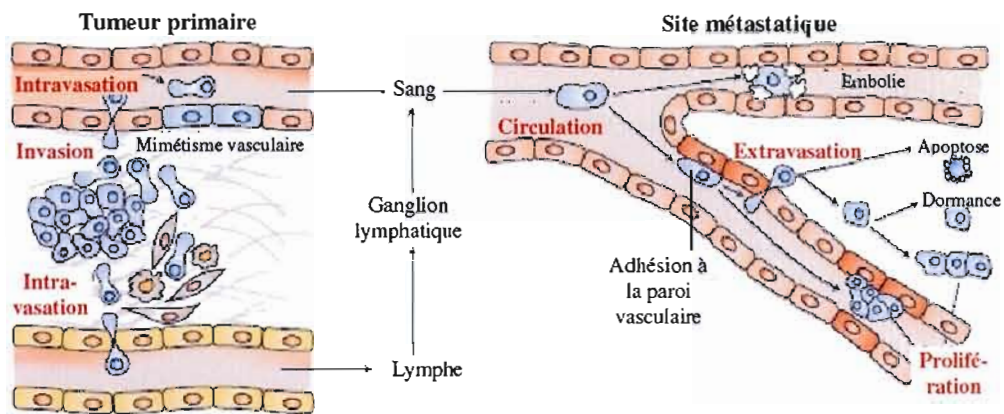


Figure 1.8 Étapes du processus de métastase. Le processus de métastase implique l'invasion des tissus par les cellules tumorales, leur intravasation dans la circulation sanguine ou lymphatique, leur extravasation et la colonisation des organes distants. Illustration tirée et modifiée de (Sahai, 2007).

CHAPITRE II

LA MT1-MMP

La métalloprotéase matricielle de type membranaire 1 (MT1-MMP, MMP-14) fait partie de la grande famille des MMP. C'est en 1994 que l'équipe de recherche de Motoharu Seiki a découvert la MT1-MMP, la première MMP ancrée à la membrane, comme activateur cellulaire de la proMMP-2 (pro-gélatinase A) (Sato *et al.*, 1994). Depuis lors, la MT1-MMP a été et continue d'être l'objet d'intenses investigations, et plusieurs études ont mis en évidence l'importance de l'activité protéolytique de cette enzyme aussi bien dans des processus physiologiques normaux que dans diverses pathologies, incluant la progression tumorale. Dans ce chapitre, différents aspects de la MT1-MMP sont abordés, à savoir ses caractéristiques structurales, ses substrats, ses différents modes de régulation, ses rôles physiologiques et également ses rôles dans la progression tumorale. Le développement de nouvelles molécules ayant pour cible la MT1-MMP, et toutes les MMP en général, est également décrit.

2.1 Caractéristiques structurales de la MT1-MMP

La MT1-MMP est constituée de sept domaines différents : un pré/propeptide (M¹-R¹¹¹), un domaine catalytique (Y¹¹²-G²⁸⁵) contenant un site consensus de liaison au Zn²⁺, une région charnière (E²⁸⁶-I³¹⁸), un domaine hémapexine (C³¹⁹-C⁵⁰⁸), une portion «linker» (P⁵⁰⁹-S⁵³⁸), un domaine transmembranaire (A⁵³⁹-F⁵⁶²) de même qu'un domaine cytoplasmique (R⁵⁶³-V⁵⁸²) en C-terminal (voir Figure 2.1) (Brinckerhoff et Matrisian, 2002 ; Sato *et al.*, 1994

; Seiki, 2003). Comme toutes les autres MMP, la MT1-MMP est exprimée sous forme de zymogène (proMT1-MMP). Elle contient un site de reconnaissance par la furine (R¹⁰⁸-R¹¹¹) entre les domaines pro- et catalytique, et elle est clivée par des convertases de proprotéines telles que la furine dans les vésicules de sécrétion dans le Golgi (Sato *et al.*, 1996 ; Yana et Weiss, 2000). La MT1-MMP est ensuite acheminée à la membrane plasmique sous forme active de 55-60 kDa (Remacle *et al.*, 2005). On retrouve également des formes membranaires de 44-45 kDa dans lesquelles le domaine catalytique a été enlevé, résultat d'un auto-clivage ou d'une protéolyse par la MMP-2 (voir Figure 2.1) (Lehti *et al.*, 1998 ; Stanton *et al.*, 1998 ; Toth *et al.*, 2002).

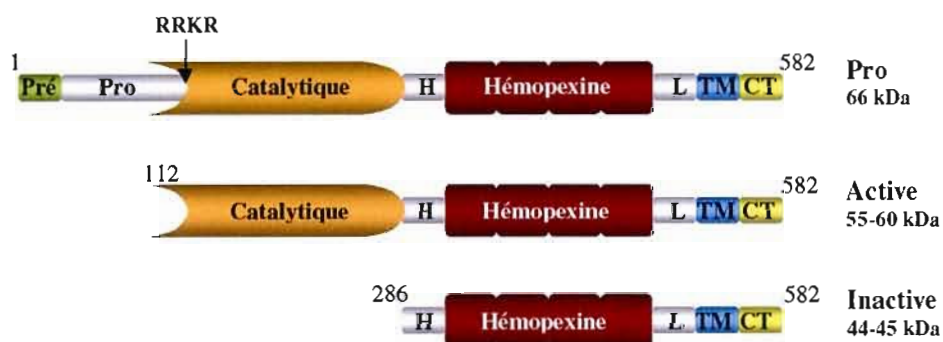


Figure 2.1 Domaines structuraux de la MT1-MMP. Pré/Pro : Pré/Propeptide ; domaine catalytique ; H : domaine charnière (hinge) ; domaine hémoexine ; L : domaine «linker» ; TM : domaine transmembranaire ; CT : domaine cytoplasmique. RRKR : site de reconnaissance de la furine.

2.2 Substrats de la MT1-MMP

Durant les dernières années, un nombre impressionnant de substrats de la MT1-MMP ont été découverts. Les substrats de la MT1-MMP sont aussi nombreux que diversifiés, et incluent des substrats solubles aussi bien que ceux associés à la surface cellulaire, des facteurs de croissance, leurs récepteurs, des composants de la MEC... (voir Tableau 2.1).

2.2.1 Composants de la MEC

Suite à la découverte de la MT1-MMP comme activateur de la proMMP-2, plusieurs études ont montré que cette enzyme agit également en tant que collagénase interstitielle, étant capable de cliver *in vitro* les collagènes interstitiels de type I, II et III (d'Ortho *et al.*, 1997 ; Ohuchi *et al.*, 1997). Ces données ont été confirmées plus tard avec la génération de souris transgéniques déficientes pour le gène de la MT1-MMP (MT1-MMP^{-/-}), démontrant par la même occasion un rôle pour cette enzyme dans le développement embryonnaire. En effet, les souris MT1-MMP^{-/-} présentaient de graves anomalies des tissus conjonctifs, incluant le nanisme, l'ostéopénie, la fibrose des tissus mous, l'arthrite et la dysplasie squelettique, résultant de l'absence de dégradation des collagènes interstitiels durant le développement (Holmbeck *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2000).

La MT1-MMP est également capable de cliver les glycoprotéines d'adhésion et les protéoglycanes. Parmi les glycoprotéines, on retrouve la fibronectine, les laminines, la vitronectine, la tenascine, le nidogène (d'Ortho *et al.*, 1997 ; Ohuchi *et al.*, 1997), la fibrine et le fibrinogène (Hiller *et al.*, 2000 ; Hiraoka *et al.*, 1998 ; Hotary *et al.*, 2002). La gélatine, la caséine et l'élastine sont aussi des substrats de la MT1-MMP (Imai *et al.*, 1996). Elle clive également des protéoglycanes telles que l'aggrecane et la perlecane (d'Ortho *et al.*, 1997). La lumican, une petite protéoglycane qui peut agir en tant que suppresseur de tumeurs, est également clivée par la MT1-MMP (Li *et al.*, 2004).

Tableau 2.1 Diversité des substrats de la MT1-MMP

<i>Substrats*</i>	
Composants de la MEC	Protéines solubles sécrétées
Aggrecane	
Caséine	Interleukine 8
Collagènes de type I, II et III	MBL
Élastine	MCP-3
Fibrine	MT1-MMP
Fibrinogène	proMMP-2, -8, -13
Fibronectine	proTNF- α
Gélatine	SDF-1
Laminines	TGF- β
Lumican	
Nidogène	Protéine intracellulaire
Perlecan	Péricentrine
Ténascine	
Vitronectine	Protéines de surface
	Sous unités pro- α v et pro- α 5
Autres	Cadhérines E et N
Sémaphorine D	CD44
Apolipoprotéine E	LRP
Transglutaminase tissulaire	RANKL
	Syndecan-1
	EMMPRIN

* Il ne s'agit pas d'une liste exhaustive

2.2.2 Protéines solubles

Une des fonctions de la MT1-MMP est d'activer des enzymes latentes, comme la proMMP-2, tel que décrit précédemment. Elle est également impliquée dans l'activation de la proMMP-8 (Holopainen *et al.*, 2003) et de la proMMP-13 (Knauper *et al.*, 2002), des enzymes qui participent également à la dégradation des collagènes interstitiels.

La MT1-MMP régule également la disponibilité de certains facteurs de croissance péricellulaires. C'est le cas du facteur de croissance transformant bêta (TGF- β), dont la forme

latente est clivée par la MT1-MMP présente à la surface des cellules épithéliales neuronales et des ostéoblastes (Mu *et al.*, 2002).

Plusieurs cytokines sont également des substrats de la MT1-MMP, suggérant que l'enzyme joue un rôle dans l'inflammation et la réponse immunitaire. Parmi ces cytokines, on retrouve le facteur dérivé des cellules stromales SDF-1 (McQuibban *et al.*, 2001) et la protéine chimioattractante des monocytes MCP-3 (McQuibban *et al.*, 2002). De même, une étude protéomique a montré que la MT1-MMP pouvait cliver l'interleukine 8, le facteur de nécrose tissulaire alpha (TNF- α) et le facteur de croissance des tissus conjonctifs (Tam *et al.*, 2004). La MT1-MMP joue également un rôle dans la réponse immunitaire innée en clivant la lectine liant le mannose (MBL) (Butler *et al.*, 2002).

Bien que la MT1-MMP soit localisée à la membrane plasmique, des études ont montré une accumulation de l'enzyme dans les centrosomes (Golubkov *et al.*, 2005 ; Golubkov *et al.*, 2005), où elle clive la péricentrine, une protéine présente dans ces structures (Golubkov *et al.*, 2006).

2.2.3 Protéines de surface

La MT1-MMP est directement impliquée dans l'activation de certains précurseurs des intégrines, entre autres les sous unités pro- α v (Ratnikov *et al.*, 2002), pro- α 5 (Baciu *et al.*, 2003), ainsi que dans le clivage des cadhérines E et N (Covington, Burghardt et Parrish, 2006). Également, des études ont démontré que le clivage de CD44, le récepteur du hyaluronane, par la MT1-MMP augmente la motilité cellulaire (Kajita *et al.*, 2001). Plusieurs autres protéines sont également clivées par la MT1-MMP (voir Tableau 2.1).

2.3 Régulation de la MT1-MMP

2.3.1 Régulation de l'expression génique

La majorité des gènes des MMP, notamment les gènes *MMP-1*, *MMP-3* et *MMP-9*, ne sont pas exprimés de façon constitutive, et leur expression est induite par des facteurs de croissance tels le facteur de croissance de l'épiderme (EGF), par des cytokines pro-inflammatoires comme le facteur de nécrose tissulaire alpha (TNF- α) et l'interleukine 1 bêta (IL-1 β), et par des phorbol esters (Birkedal-Hansen *et al.*, 1993). Parmi toutes les MMPs, le gène de la MT1-MMP est unique puisqu'il est constitutivement exprimé *in vitro* par les fibroblastes, les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Bien que la taille du gène *MT1-MMP* soit similaire à celle de la majorité des gènes *MMP* (10 exons), son organisation présente des différences notables au niveau des exons 2 à 4. Dans tous les autres gènes *MMP*, l'exon 2 encode pour la majorité du prodomaine et la portion N-terminale du domaine catalytique, alors que dans le gène *MT1-MMP* le prodomaine est encodé par les exons 2 et 3. De plus, l'exon 4 du gène *MT1-MMP*, beaucoup plus long, contient des séquences homologues aux exons 3 et 4 des autres gènes *MMP* (Lohi *et al.*, 2000).

Lorsque comparé aux promoteurs des autres gènes *MMP*, le promoteur du gène *MT1-MMP* montre des similitudes avec le gène *MMP-2* et des différences avec les autres gènes *MMP*. Alors que la majorité des gènes *MMP* possèdent une séquence conservée TATA près de la position -25, de même que des sites de liaison pour les facteurs de transcription Ets, NF- κ B et AP-1 à la position -80, qui semblent responsables de l'effet des facteurs de croissance et des cytokines, ces éléments sont absents du gène *MT1-MMP*. De plus, le promoteur du gène *MT1-MMP* a des sites de liaison pour Sp1 et Egr-1 qui sont très importants pour son activité basale (Lohi *et al.*, 2000 ; Seiki et Yana, 2003).

L'expression de la MT1-MMP est augmentée par la concanavaline A, une lectine végétale (Yu *et al.*, 1995). De plus, elle est régulée par des interactions entre la MEC et le cytosquelette. En effet, l'expression la MT1-MMP est augmentée dans les fibroblastes lorsqu'ils sont cultivés dans une matrice de collagène 3D (Gilles *et al.*, 1997), par un stress mécanique (Tyagi *et al.*, 1998) et par la cytochalasine D, un agent perturbateur du cytosquelette (Ailenberg et Silverman, 1996). La caténine β , via la formation d'un complexe avec Tcf4, est également impliquée dans la régulation de l'expression de la MT1-MMP (Takahashi *et al.*, 2002). Il a également été démontré que l'oncogène *v-Src* augmente la transcription génique de la MT1-MMP (Cha *et al.*, 2000).

2.3.2 Régulation de l'activité protéolytique

2.3.2.1 Activation de l'activité de la MT1-MMP

Tel que mentionné précédemment, la MT1-MMP est synthétisée sous forme latente, et son domaine propeptide doit être clivé afin que l'enzyme soit active, générant ainsi une forme de 55 à 60 kDa (voir Figure 2.1). L'activation de la MT1-MMP s'effectue principalement par la furine, une convertase de proprotéines (Sato *et al.*, 1996 ; Yana et Weiss, 2000). Toutefois, il existe d'autres voies d'activation de la MT1-MMP. L'utilisation de l'inhibiteur de protéases $\alpha 1$ ($\alpha 1$ PDX), un composé qui inhibe spécifiquement la furine et la convertase de proprotéines 6 (PC6) (Cui *et al.*, 1998 ; Jean *et al.*, 1998), a permis d'identifier la PC6 comme un autre activateur de la MT1-MMP (Yana et Weiss, 2000). D'autres études ont proposé le rôle de certaines protéases dans l'activation de la MT1-MMP ; il s'agit entre autres de la trypsine (Will *et al.*, 1996), de la plasmine (Okumura *et al.*, 1997) et de l'urokinase (Kazes *et al.*, 1998). L'existence de la forme active de la MT1-MMP peut également être le résultat d'une auto-activation. En effet, la MT1-MMP est capable de cliver son propre domaine propeptide et ce, après le site de reconnaissance de la furine (¹⁰⁸RRKR) (Rozanov et Strongin, 2003).

2.3.2.2 Inhibition de l'activité de la MT1-MMP

Plusieurs études ont démontré que la forme active de la MT1-MMP (55-60 kDa) subit des clivages supplémentaires par la MMP-2 ou la MT1-MMP elle-même, menant à la création de formes de 44 à 45 kDa (Lehti *et al.*, 1998 ; Stanton *et al.*, 1998 ; Toth *et al.*, 2002). Cette protéolyse enlève le domaine catalytique de la MT1-MMP, la rendant par le fait même inactive. Bien que la présence des formes de 44 à 45 kDa de la MT1-MMP témoigne d'une régulation négative de l'enzyme, elle peut également constituer une indication du niveau d'activation de la MT1-MMP. Effectivement, la présence de niveaux élevés de la forme de 45 kDa coïncide avec des niveaux élevés d'activation de la proMMP-2, alors qu'aucune activation de proMMP-2 est observée lorsque la forme de 45 kDa de la MT1-MMP n'est pas détectée, et ce, malgré la présence de la forme mature à la surface cellulaire (Lehti *et al.*, 1998 ; Stanton *et al.*, 1998).

Les inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP-1, -2, -3 et -4) sont des inhibiteurs endogènes des MMP et inhibent leur activité enzymatique en se liant à leur site catalytique (Brew, Dinakarandian et Nagase, 2000). Alors que l'activité enzymatique de la MT1-MMP est inhibée par les inhibiteurs TIMP-2, -3 et -4, elle ne l'est pas par TIMP-1 (Bigg *et al.*, 2001 ; Will *et al.*, 1996). Une attention particulière doit être accordée à TIMP-2, car non seulement il inhibe l'activité protéolytique de la MT1-MMP, mais aussi son interaction avec l'enzyme participe à l'activation de la proMMP-2 (Butler *et al.*, 1998 ; Strongin *et al.*, 1995). Cet aspect sera décrit ultérieurement.

RECK (*REversion-inducing-Cystein rich protein with Kazal motifs*), une glycoprotéine associée à la membrane par une ancre GPI, est un autre inhibiteur endogène de la MT1-MMP (Oh *et al.*, 2001). RECK inhibe également l'expression et l'activité enzymatique de la MMP-9 (Takahashi *et al.*, 1998), de même que l'activité de la MMP-2 (Oh *et al.*, 2001). Bien que leurs mécanismes d'action ne soient pas connus, les protéoglycanes testicane-3 et N-Tes inhibent l'activité de la MT1-MMP (Nakada *et al.*, 2001).

2.3.3 Régulation de la localisation

La disponibilité de la MT1-MMP à la surface cellulaire est finement contrôlée par l'endocytose, un processus complexe servant à rediriger les protéines membranaires d'une part, vers les lysosomes afin qu'elles y soient dégradées ; d'autre part, vers les vésicules de sécrétion afin qu'elles soit recyclées à la membrane plasmique (Conner et Schmid, 2003). La MT1-MMP est internalisée via deux voies distinctes d'endocytose : l'une impliquant des vésicules recouvertes de clathrine et l'autre se produisant via les cavéoles. Plusieurs études ont démontré que la portion cytoplasmique de la MT1-MMP est très importante pour l'internalisation de cette dernière, car des formes de l'enzyme dont la portion cytoplasmique a été tronquée restent localisées à la surface cellulaire alors que la forme sauvage de l'enzyme est rapidement internalisée (Jiang *et al.*, 2001 ; Lehti *et al.*, 2000 ; Uekita *et al.*, 2001). L'endocytose de la MT1-MMP via les vésicules tapissées de clathrine nécessite la présence du motif L⁵⁷¹LY dans la portion cytoplasmique de l'enzyme (Lehti *et al.*, 2000). De plus, il a été démontré que ce motif dileucine et tyrosine interagit avec la sous-unité $\alpha 2$ de l'AP-2, un composant des vésicules tapissées de clathrine. Bien qu'il ait été démontré que la MT1-MMP peut également être internalisée via les cavéoles (Galvez *et al.*, 2004 ; Remacle, Murphy et Roghi, 2003), les mécanismes impliqués dans ce processus restent encore peu élucidés. Toutefois, l'interaction, via ses résidus cytoplasmiques Cys⁵⁷⁴ et Val⁵⁸², de la MT1-MMP avec la cavéoline-1, la protéine majeure des cavéoles (Labrecque *et al.*, 2004), pourrait suggérer un rôle pour la cavéoline-1 dans ce processus. Le recyclage de la MT1-MMP à la surface de la cellule joue un rôle important dans la migration cellulaire. Il a été démontré que la MT1-MMP est recyclée aux fronts de migration des cellules afin de contribuer à la protéolyse péricellulaire en direction du sens de la migration (Remacle, Murphy et Roghi, 2003).

2.4 Rôles de la MT1-MMP dans la progression tumorale

2.4.1 Expression de la MT1-MMP dans les tumeurs

L'expression de la MT1-MMP a été rapportée pour la première fois dans les cellules de carcinome pulmonaire de même que dans les fibroblastes adjacents (Sato *et al.*, 1994). Depuis lors, l'expression de la MT1-MMP a été observée dans plusieurs types de cancer, incluant les cancers du poumon (Nawrocki *et al.*, 1997 ; Polette *et al.*, 1996 ; Tokuraku *et al.*, 1995), gastriques (Bando *et al.*, 1998 ; Mori *et al.*, 1997 ; Nomura *et al.*, 1995), du côlon (Ohtani *et al.*, 1996), du foie (Harada *et al.*, 1998), du pancréas (Imamura *et al.*, 1998), du sein (Ishigaki *et al.*, 1999 ; Polette *et al.*, 1996 ; Ueno *et al.*, 1997), de la vessie (Kanayama *et al.*, 1998), de la tête et du cou (Yoshizaki *et al.*, 1997), de la thyroïde (Nakamura *et al.*, 1999), de l'ovaire (Afzal *et al.*, 1998 ; Fishman, Bafetti et Stack, 1996), du col de l'utérus (Fishman, Bafetti et Stack, 1996), du cerveau (Forsyth *et al.*, 1999 ; Nakada *et al.*, 1999 ; Yamamoto *et al.*, 1996), et également dans les mélanomes (Hofmann *et al.*, 2000). De plus, les niveaux d'expression de la MT1-MMP dans les tumeurs sont corrélés avec un mauvais pronostic pour les patients atteints de cancer (Seiki, 2003).

2.4.2 Rôle dans l'angiogenèse tumorale

La migration des cellules endothéliales durant l'angiogenèse tumorale, tel que décrit dans le Chapitre I, requiert la dégradation et le remodelage de la MEC. La MT1-MMP joue un rôle majeur dans l'angiogenèse aussi bien physiologique que tumorale (Pepper, 2001). L'implication de la MT1-MMP dans le processus d'angiogenèse s'exerce à plusieurs étapes. Dans un premier temps, la MT1-MMP est impliquée dans le processus initial de l'angiogenèse tumorale, soit l'activation des cellules endothéliales par des facteurs de croissances sécrétés par les tumeurs. En effet, plusieurs études ont démontré que l'expression de la MT1-MMP dans les cellules tumorales augmente l'expression du VEGF par ces

dernières et l'angiogenèse subséquente (Deryugina, Soroceanu et Strongin, 2002 ; Munaut *et al.*, 2003 ; Sounni *et al.*, 2002 ; Sounni *et al.*, 2004). Dans un deuxième temps, la MT1-MMP est impliquée dans l'invasion de la MEC par les cellules endothéliales, via la dégradation de ses composants. Par exemple, l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la MT1-MMP empêche l'invasion de gels de fibrine ou de collagène de type I par les cellules endothéliales humaines (Galvez *et al.*, 2001). Également, des études ont montré que la présence de la MT1-MMP est nécessaire pour la migration des cellules endothéliales sur divers composants de la MEC, tels que la gélatine, la fibronectine, le collagène de type I et la vitronectine (Galvez *et al.*, 2001 ; Galvez *et al.*, 2002). De plus, nous avons démontré dans une étude précédente une coopération entre la MT1-MMP et la sphingosine-1-phosphate (S1P) dans l'induction de la formation de structures de type capillaire (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004). La MT1-MMP joue également un rôle crucial dans la stabilisation des capillaires immatures néo-formés par le recrutement de cellules murales. En effet, la MT1-MMP agit de concert avec le PDGF- β dans la régulation de la stabilisation des microvaisseaux par les cellules musculaires lisses (Lehti *et al.*, 2005). Enfin, la MT1-MMP participe aux processus impliqués dans la maintenance et l'homéostasie du lit vasculaire tumoral, tels que l'apoptose des cellules endothéliales (Langlois *et al.*, 2005).

2.4.3 Rôle dans l'invasion tumorale

La MT1-MMP promeut l'invasion tumorale en dégradant la barrière que constitue la MEC, permettant ainsi aux cellules tumorales de s'y frayer un chemin (voir Figure 2.2). Parmi les composants de la MEC, le collagène représente le substrat le plus abondant, et par conséquent, un obstacle majeur pour la migration des cellules. À cause de sa structure en triple hélice qui forme spontanément des fibres à pH neutre à 37°C, la majorité des protéases ne peuvent dégrader le collagène à pH neutre, excepté les collagénases membres de la famille des MMP telles que les MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-13 et la MT1-MMP (Visse et Nagase, 2003).

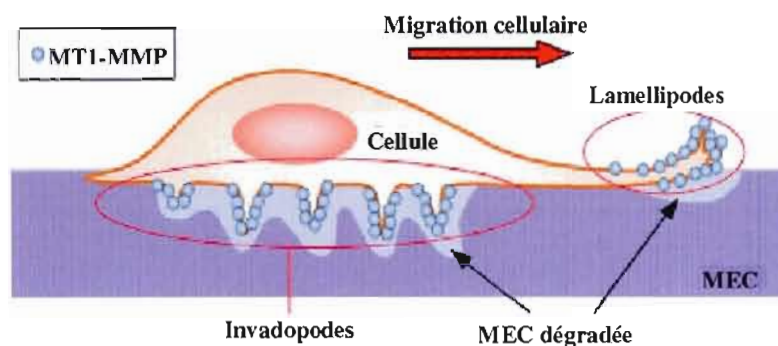


Figure 2.2 Localisation de la MT1-MMP lors de la migration cellulaire. Durant la migration cellulaire, la MT1-MMP est localisée dans des extensions de la membrane plasmique appelées lamellipodes et invadopodes. La régulation de la localisation de la MT1-MMP dans ces structures permet la dégradation péri-cellulaire localisée lors du processus de migration cellulaire. Tiré et modifié de (Itoh, 2006).

Des études ont démontré que la MT1-MMP, mais pas les autres collagénases, peut promouvoir l'invasion de matrices de collagène 3D par les cellules épithéliales (Hotary *et al.*, 2000), les fibroblastes (Sabeh *et al.*, 2004) et les cellules tumorales (Sabeh *et al.*, 2004). La localisation transmembranaire de la MT1-MMP est très importante pour son activité protéolytique, car un mutant soluble de l'enzyme est incapable de promouvoir la migration cellulaire (Hotary *et al.*, 2000). Dans le même ordre d'idée, l'inhibition de l'activité protéolytique de la MT1-MMP bloque complètement l'invasion de matrices de collagène 3D par les cellules tumorales (Sabeh *et al.*, 2004).

Un autre rôle de la MT1-MMP dans l'invasion tumorale est l'amplification de la protéolyse péri-cellulaire, via l'activation de la proMMP-2 (Sato *et al.*, 1994) et de la proMMP-13 (Knauper *et al.*, 2002 ; Knauper *et al.*, 1996). La MMP-2 est également un acteur important dans le processus d'invasion tumorale puisqu'elle peut cliver le collagène de type IV, un composant majeur de la membrane basale. La MT1-MMP n'est pas capable de cliver le collagène de type IV (Ohuchi *et al.*, 1997). Toutefois, l'activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP élargit l'éventail de substrats de la MT1-MMP et permet aux cellules qui

l'expriment de traverser la membrane basale. L'activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP est un processus extrêmement complexe qui requiert au moins deux molécules de MT1-MMP, formant ainsi un homodimère via le domaine hémapexine de l'enzyme (voir Figure 2.3) (Itoh *et al.*, 2001 ; Lehti *et al.*, 2002). L'une de ces molécules est inhibée par TIMP-2, en formant un complexe avec l'enzyme, via la liaison du domaine N-terminal de TIMP-2 au site actif dans le domaine catalytique de la MT1-MMP (Strongin *et al.*, 1995). Le domaine C-terminal libre de TIMP-2, ayant une affinité pour le domaine hémapexine de la proMMP-2, se lie à cette dernière, résultant ainsi en la formation d'un hétéro-tétramère à la surface cellulaire ((MT1-MMP)₂ – TIMP-2 – proMMP-2). La seconde molécule MT1-MMP, qui elle n'est pas liée à TIMP-2, active alors la proMMP-2 à l'intérieur de ce complexe.

Les mécanismes d'activation de la proMMP-13 par la MT1-MMP ne sont pas encore élucidés. Toutefois, elle ne requiert pas le concours de TIMP-2, mais implique le domaine hémapexine de la proMMP-13, suggérant ainsi le recrutement de la proMMP-13 à la surface cellulaire par une molécule réceptrice via son domaine hémapexine (Knauper *et al.*, 2002).

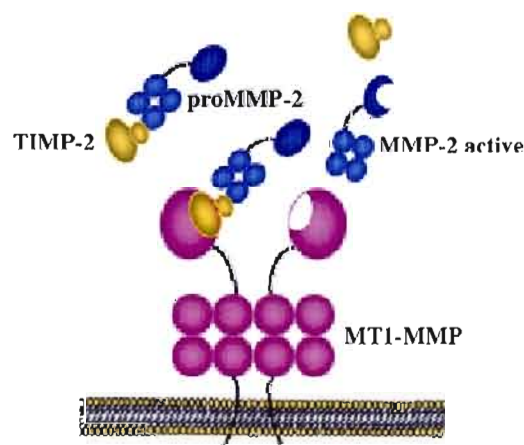


Figure 2.3 Activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP à la surface cellulaire. L'activation de la proMMP-2 par la MT1-MMP requiert la formation d'un complexe entre un homodimère de MT1-MMP, TIMP-2 et la proMMP-2.
Tiré et modifié de (Barbolina et Stack, 2008)

Le clivage des molécules d'adhésion constitue une autre fonction de la MT1-MMP impliquée dans l'invasion tumorale. Par exemple, la MT1-MMP clive CD44, un récepteur du hyaluronane jouant un rôle important dans la migration cellulaire (Kajita *et al.*, 2001 ; Naor, Sionov et Ish-Shalom, 1997). Le clivage de CD44 par la MT1-MMP promeut la migration cellulaire en modifiant l'adhésion de la cellule à la MEC, adhésion dépendante du récepteur CD44 (Kajita *et al.*, 2001). La protéolyse extracellulaire de CD44 par la MT1-MMP entraîne un clivage successif de la portion cytoplasmique de CD44, générant ainsi un fragment transloqué dans le noyau afin d'activer la transcription de différents gènes impliqués dans la migration cellulaire (Okamoto *et al.*, 2001). La MT1-MMP clive également syndecan-1, un autre récepteur transmembranaire responsable de l'adhésion des cellules aux composants de la MEC, incluant la fibronectine et les collagènes (Endo *et al.*, 2003). Également, des études effectuées dans notre laboratoire et par d'autres équipes ont démontré que l'expression de la MT1-MMP active la kinase ERK (*Extracellular signal-Regulated protein Kinase*), ce phénomène étant important pour la migration cellulaire dépendante de la MT1-MMP (Gingras *et al.*, 2001 ; Takino *et al.*, 2004). L'activation de la protéine ERK par la MT1-MMP pourrait donc représenter une voie par laquelle le clivage de CD44 et syndecan-1 induit la migration cellulaire.

La MEC regorge de molécules bioactives qui, une fois libérées, activent différentes fonctions cellulaires, telles que la migration. Le clivage de la laminine 5, un composant abondant de la membrane basale, par la MT1-MMP illustre bien ce phénomène. Ce clivage entraîne la libération de molécules semblables au facteur de croissance de l'épiderme (EGF) (Koshikawa *et al.*, 2000 ; Schenk *et al.*, 2003). Ces molécules peuvent alors se lier au récepteur de l'EGF (erbB1), promouvant par conséquent la migration des cellules du cancer de la prostate (Udayakumar *et al.*, 2003).

2.4.4 Rôle dans le processus de métastase

Plusieurs études ont démontré que l'expression de la MT1-MMP par les cellules tumorales induit la formation de métastases expérimentales (Cao *et al.*, 2005 ; Shen *et al.*, 2007 ; Szabova *et al.*, 2008 ; Tsunetzuka *et al.*, 1996). Un des mécanismes impliqués dans l'induction du processus de métastase par la MT1-MMP est le clivage de la métastine par l'enzyme. La métastine est un peptide provenant du clivage de KiSS-1, une protéine qui inhibe la métastase des mélanomes (Lee *et al.*, 1996). Ainsi, le clivage de la métastine par la MT1-MMP annule l'effet inhibiteur de ce peptide sur la métastase des mélanomes (Takino *et al.*, 2003).

2.5 La MT1-MMP comme cible thérapeutique anti-tumorale

Les rôles cruciaux qu'exerce la MT1-MMP à plusieurs niveaux de la progression tumorale font de cette enzyme, et des autres membres de la famille des MMP, une cible de choix quant au développement de médicaments visant à éliminer les tumeurs cancéreuses. Sur cette base, l'industrie pharmaceutique a déployé des efforts considérables durant les 20 dernières années dans le développement d'inhibiteurs de MMP (MMPI) afin de pouvoir offrir aux patients atteints de cancer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'activité protéolytique des MMP dépend de la présence des ions Zn^{2+} , et cette caractéristique a été utilisée dans le développement de molécules pouvant agir comme chélateurs de zinc. Ainsi, plusieurs classes de MMPI ont été développées mais la majorité des molécules ont été retirées des études cliniques en raison de leur faible spécificité, leur faible biodisponibilité et leurs effets secondaires graves (Tu *et al.*, 2008). Parmi ces MMPI, on retrouve le Marimastat (BB-2516), le Prinomastat (AG3340), le Tanomastat (BAY 12-9566) et le Metastat (Tu *et al.*, 2008).

Les résultats décevants de ces essais cliniques relèvent ainsi l'importance de mieux connaître les MMP. Une meilleure compréhension des fonctions de la MT1-MMP apparaît donc essentielle pour améliorer les effets des médicaments visant la progression tumorale.

DEUXIÈME PARTIE

CONTRIBUTIONS PERSONNELLES

CHAPITRE III

PROJET DE RECHERCHE

3.1 Problématique

Durant la dernière décennie, de nombreuses études se sont consacrées à étudier le rôle de la MT1-MMP dans la progression tumorale. L'importance de cette enzyme s'est faite grandissante, du fait de son implication à différentes, sinon à toutes les étapes de la progression tumorale. En effet, la MT1-MMP participe à l'angiogenèse tumorale, l'étape initiale et déterminante de la progression tumorale puisqu'elle permet à une tumeur latente de se développer via un apport continu en oxygène et nutriments provenant du réseau vasculaire de l'organisme. Également, la MT1-MMP participe activement aux processus d'invasion tumorale et de métastase. De par son activité protéolytique, la MT1-MMP, dont la diversité et le nombre de substrats sont très impressionnants, permet aux cellules tumorales de franchir les barrières extrêmement denses imposées par la MEC. Cibler l'activité protéolytique des MMP nous apparaît alors comme une stratégie logique et judicieuse afin de développer de nouvelles molécules capables de bloquer la progression tumorale. Malgré tous les efforts déployés par l'industrie pharmaceutique à cet égard, les résultats d'essais cliniques impliquant les inhibiteurs MMP n'ont pas été concluants, dû à leur manque de spécificité (car ils inhibent également d'autres protéases), leur faible biodisponibilité et leurs effets secondaires graves. Il convient donc de « repenser » les stratégies actuelles et d'approfondir davantage notre compréhension des mécanismes d'action des MMP.

Contrairement aux MMP sécrétées, la MT1-MMP est capable d'interagir autant avec le milieu extracellulaire qu'avec l'environnement intracellulaire, de par sa caractéristique de protéine transmembranaire. Parmi ses différents domaines structuraux, le domaine catalytique extracellulaire de la MT1-MMP est le plus étudié et le mieux caractérisé. Cependant, quelques études ont montré l'implication du domaine hémapexine de la MT1-MMP dans l'interaction de l'enzyme avec CD44 et la formation d'homodimères à la surface cellulaire, deux mécanismes impliqués dans l'invasion tumorale (Itoh, 2006 ; Itoh *et al.*, 2001).

Le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP participe aux événements impliqués dans la progression tumorale. D'une part, des études réalisées dans notre laboratoire démontrent son implication dans le processus d'angiogenèse tumorale. En effet, l'expression d'un mutant de la MT1-MMP dont le domaine cytoplasmique a été tronqué empêche la formation de structures de type capillaire et la migration des cellules endothéliales *in vitro*, alors que la forme sauvage stimule ces phénomènes (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004). De plus, le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP participe au maintien de l'homéostasie du lit vasculaire, puisque la délétion de cette portion inhibe la sensibilisation par l'enzyme des cellules endothéliales à l'apoptose (Langlois *et al.*, 2005). La portion cytoplasmique de la MT1-MMP est également impliquée dans le processus d'invasion tumorale. Effectivement, le motif LLY⁵⁷³ est nécessaire pour l'internalisation de l'enzyme par le biais des vésicules tapissées de clathrine, car il permet l'interaction de la MT1-MMP avec la protéine adaptatrice AP-2 (Galvez *et al.*, 2004 ; Remacle, Murphy et Roghi, 2003). La palmitoylation du résidu C⁵⁷⁴ est également cruciale pour l'internalisation de la MT1-MMP par la voie des vésicules tapissées de clathrine (Anilkumar *et al.*, 2005). Sa présence nécessaire à l'interaction de la MT1-MMP avec la cavéoline-1 phosphorylée via les résidus C⁵⁷⁴ et V⁵⁸³, tel que démontré dans une étude réalisée dans notre laboratoire, suggère que le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP contribuerait à l'endocytose de l'enzyme via les cavéoles (Labrecque *et al.*, 2004). Également, il a été observé dans notre laboratoire que la MT1-MMP interagit avec les kinases membres de la famille Src, incluant Src et Fyn, une interaction dépendante du domaine cytoplasmique de l'enzyme (Béliveau, 2005). Tous ces phénomènes contribuent à la migration cellulaire induite par l'enzyme. Aussi, la séquence cytoplasmique C-terminale DKV⁵⁸³ joue un rôle important dans le recyclage de l'enzyme (Wang *et al.*, 2004). Plusieurs

études réalisées dans notre laboratoire démontrent un rôle du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP dans la signalisation intracellulaire. En effet, la portion cytoplasmique de la MT1-MMP est impliquée dans l'activation de la kinase ERK induite par la MT1-MMP (Gingras *et al.*, 2001). De plus, la localisation de l'enzyme dans les cavéoles (Annabi *et al.*, 2001), des microdomaines de la membrane plasmique qui regorgent de molécules impliquées dans la transduction de signal (Razani, Woodman et Lisanti, 2002), contribue probablement à la signalisation cellulaire induite par la MT1-MMP.

Bien que l'implication du domaine cytoplasmique dans les fonctions de la MT1-MMP, incluant l'angiogenèse, la migration et l'invasion tumorale, ait été clairement démontrée, les mécanismes par lesquelles cette portion de l'enzyme contribue à la progression tumorale sont encore peu compris. Les travaux présentés dans cette thèse tentent d'élucider ces mécanismes.

3.2 Hypothèses de travail

Étant donné que :

- la MT1-MMP active la transduction de signal intracellulaire via l'activation de la kinase ERK par un mécanisme impliquant la portion cytoplasmique de l'enzyme (Gingras *et al.*, 2001) ;
- la MT1-MMP interagit avec la kinase Src, une kinase qui phosphoryle les résidus tyrosine, via son domaine cytoplasmique (Béliveau, 2005) ;
- la MT1-MMP possède un résidu tyrosine dans sa séquence cytoplasmique (voir Figure 3.1) ;
- La transduction de signaux intracellulaires s'effectue par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation ;

Alors, la MT1-MMP pourrait être phosphorylée sur son unique résidu tyrosine cytoplasmique par un processus impliquant le concours de la kinase Src.

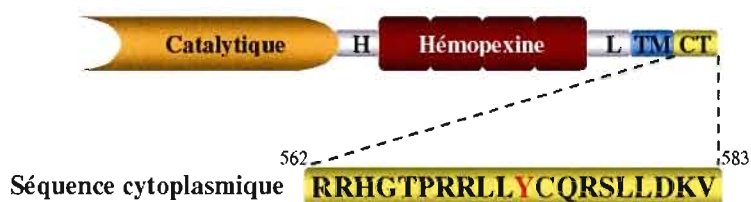


Figure 3.1 Séquence cytoplasmique de la MT1-MMP. La portion cytoplasmique de la MT1-MMP est constituée de 20 acides aminés et comprend un résidu tyrosine (Y^{573}) susceptible d'être phosphorylé. Domaine catalytique; H: domaine charnière (hinge); domaine hémoexine; L: domaine «linker»; TM: domaine transmembranaire; CT: domaine cytoplasmique.

3.3 Objectifs de recherche

D'abord, le premier objectif de recherche de la présente thèse était d'identifier et de caractériser la phosphorylation de la MT1-MMP sur son unique résidu tyrosine cytoplasmique (Y^{573}). Puisque nous avons précédemment démontré que la MT1-MMP interagit avec la kinase Src, nous voulions également étudier le rôle de cette kinase dans la phosphorylation de la MT1-MMP. De plus, le rôle de cette phosphorylation dans la migration des cellules tumorales et endothéliales *in vitro* a ensuite été étudié.

Puis, le second objectif de recherche était de déterminer le rôle de la phosphorylation de la MT1-MMP dans 1) la croissance de cellules tumorales dans des matrices 3D, 2) le potentiel invasif et tumorigénique de cellules tumorales, et 3) la formation de xénogreffes *in vivo*.

Ensuite, le troisième objectif de ces travaux était de vérifier si la phosphorylation de la MT1-MMP était un phénomène que l'on retrouve dans des biopsies de tumeurs provenant de patients atteints de cancer, et si cette phosphorylation était un processus important dans la progression tumorale.

Enfin, le dernier objectif des travaux décrits dans la présente thèse était d'élaborer une molécule capable d'inhiber la phosphorylation de la MT1-MMP, de caractériser et valider cette molécule dans des modèles expérimentaux de progression tumorale. En fait, le but ultime était d'amorcer le développement d'alternatives aux inhibiteurs de MMPs actuels.

3.4 Stratégie expérimentale

Dans la perspective de réaliser les objectifs de recherche de cette thèse, nous avons eu recours à diverses techniques expérimentales *in vitro*, *in vivo* et cliniques. Dans cette section, nous donnons un aperçu des principales stratégies utilisées durant les travaux de recherche présentés dans cette thèse.

3.4.1 Les études *in vitro*

Afin de pouvoir identifier et caractériser la phosphorylation de la MT1-MMP, nous avons utilisé les cellules transformées COS-7. Ce modèle cellulaire est largement utilisé car il est idéal pour des études moléculaires requérant la surexpression de protéines. Ces cellules ont donc été transfectées avec différentes formes de la MT1-MMP (sauvage et mutantes) (voir Figure 3.2), en présence de la kinase Src active ou inactive. La phosphorylation de la MT1-MMP a été déterminée par des techniques d'immunoprécipitation/immunodétection, et par l'électrophorèse en deux dimensions. Nous avons ensuite élaboré et produit des anticorps polyclonaux spécifiquement dirigés contre la forme phosphorylée de la MT1-MMP. Pour étudier l'effet de la phosphorylation sur la migration des cellules endothéliales et tumorales, nous avons utilisé trois modèles cellulaires différents. Les cellules endothéliales d'aorte bovine (BAEC) ont été utilisées parce qu'elles expriment peu ou pas la MT1-MMP, les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) parce qu'elles expriment

modérément la MT1-MMP et les cellules de fibrosarcome humain (HT-1080) parce qu'elles surexpriment la MT1-MMP.

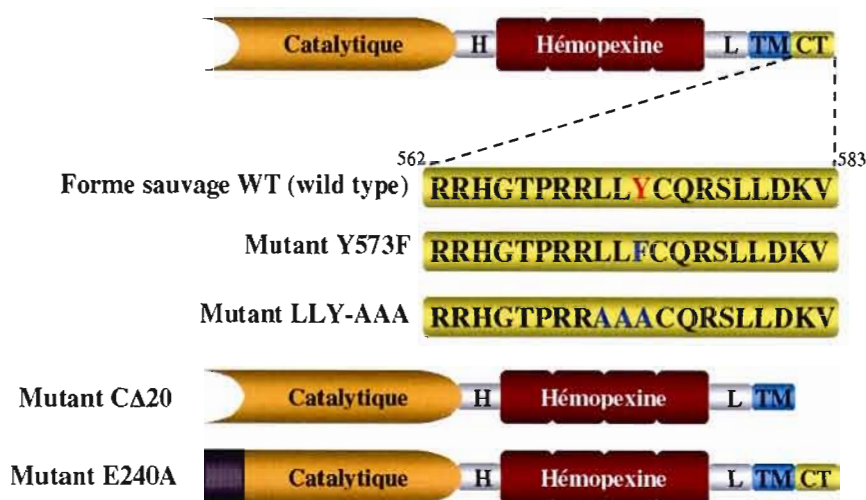


Figure 3.2 Différents mutants de la MT1-MMP utilisés dans l'identification et la caractérisation de la phosphorylation de la MT1-MMP. Domaine catalytique ; H : domaine charnière (hinge) ; domaine hémoexine ; L : domaine «linker» ; TM : domaine transmembranaire ; CT : domaine cytoplasmique.

Nous avons également évalué l'effet de la phosphorylation de la MT1-MMP sur la croissance des cellules tumorales dans des matrices tridimensionnelles. La capacité de croissance 3D est un attribut des cellules tumorales et dépend de la présence de la MT1-MMP, mais pas des autres MMPs (Hotary *et al.*, 2003). Nous avons donc utilisé un modèle de culture de cellules dans des matrices de collagène de type I 3D en comparaison avec un modèle de culture bidimensionnel traditionnellement utilisé (voir Figure 3.3). L'utilisation de ces deux modèles a permis ainsi de distinguer le rôle de la phosphorylation de la MT1-MMP dans des conditions normales (2D) de son rôle dans des conditions tumorigènes (3D).

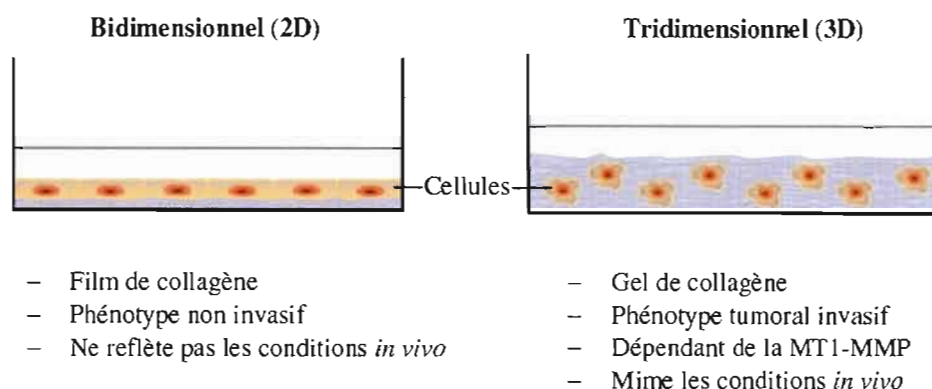


Figure 3.3 Modèles de culture de cellules 2D et 3D.

La culture 2D consiste à cultiver les cellules sur une fine couche (100 µg/ml) de collagène de type I. Par contre, dans la culture 3D, les cellules sont incorporées à l'intérieur d'un gel dense (2.7 mg/ml) de collagène de type I.

3.4.2 Les études *in vivo*

Pour étudier l'effet de la phosphorylation de la MT1-MMP dans la formation de tumeurs, nous avons utilisé des souris athymiques « nues » (CrI : CD-1® - Foxn^{nu}), selon les directives du Conseil Canadien de la Protection des Animaux. Ces souris permettent la formation de xénogreffes et par conséquent des cellules humaines peuvent y former des tumeurs. Des cellules de fibrosarcome humain (HT-1080) transfectées de façon permanente avec les formes sauvage ou non phosphorylable de la MT1-MMP ont donc été injectées en sous-cutané dans le flanc droit de la souris. Les xénogreffes ainsi formées (voir Figure 3.4) ont ensuite été analysées par immunohistochimie.

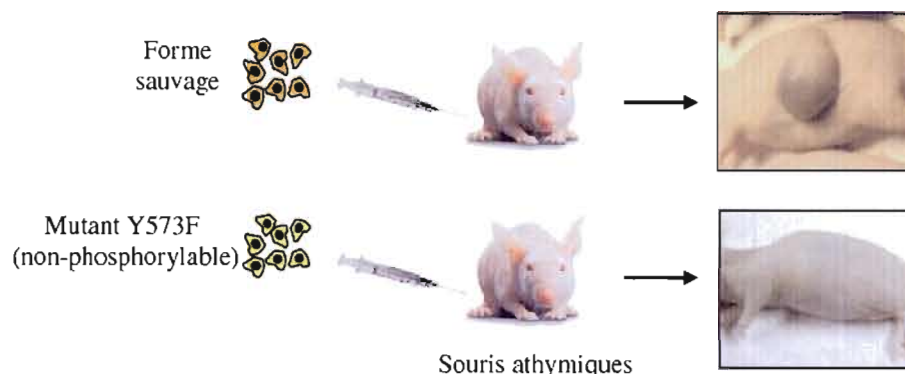


Figure 3.4 Modèle de croissance tumorale chez la souris. Les cellules de fibrosarcome humain (HT-1080), transfectées de façon permanente avec les forme sauvage ou non phosphorylable de la MT1-MMP, ont été implantées en sous-cutané sous le flan de souris athymiques. Les xénogreffes témoins atteignent une taille de 1000 mm³ après une vingtaine de jours.

3.4.3 Études cliniques

Nous avons eu recours à des études cliniques afin d'examiner s'il existe une implication de la phosphorylation de la MT1-MMP dans la progression de tumeurs chez des patients atteints de cancer. Le neuroblastome, modèle choisi pour notre étude, est une tumeur maligne pédiatrique du système nerveux sympathique. Il s'agit du cancer le plus fréquent chez le nourrisson. Chez l'enfant, 60% des neuroblastomes sont d'emblée métastatiques. Malgré les avancées effectuées dans le domaine, les nouvelles thérapies n'ont pas pu augmenter significativement la survie de ces patients. Nous avons donc utilisé des spécimens provenant de biopsies de 289 patients atteints de neuroblastome. Ces biopsies ont permis d'effectuer des « *Tissue Microarray* », pour un immunomarquage avec les anticorps polyclonaux dirigés contre la MT1-MMP phosphorylée.

3.4.4 *Élaboration d'un outil permettant d'inhiber la MT1-MMP phosphorylée*

Les résultats obtenus dans les trois premières études de la présente thèse, qui montrent que la MT1-MMP phosphorylée joue un rôle important dans la progression tumorale, nous ont mené à l'élaboration d'un outil pouvant cibler la MT1-MMP phosphorylée dans l'optique de contrer la progression tumorale. Nous avons donc conçu un peptide de 20 acides aminés, correspondant à la séquence cytoplasmique de la MT1-MMP où la tyrosine a été remplacée par une phénylalanine non phosphorylable. Ce peptide a été couplé à une séquence lui permettant de pénétrer à l'intérieur des cellules tumorales. L'effet de ce peptide sur les tumeurs a ensuite été déterminé *in vitro* et *in vivo*.

CHAPITRE IV

ARTICLES

Ce chapitre présente les résultats de recherches effectuées dans le contexte de la présente thèse. Ils sont présentés sous forme d'articles scientifiques publiés ou soumis à des revues et évalués par des comités de pairs. Ci-après se trouve la liste de ces articles.

- 4.1 **Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration.**
Nyalendo C, Michaud M, Beaulieu E, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Béliveau R. 2007. *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p.15690-15699.
- 4.2 **Impaired tyrosine phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase reduces tumor cell proliferation in three-dimensional matrices and abrogates tumor growth in mice.**
Nyalendo C, Beaulieu E, Sartelet H, Michaud M, Fontaine N, Gingras D, Béliveau R. 2008. *Carcinogenesis*. Vol. 29, p. 1655-1664.
- 4.3 **Identification of phosphorylated membrane-type 1 matrix metalloproteinase in association with neuroblastoma progression.**
Nyalendo C, Sartelet H, Barette S, Ohta S, Gingras D, Béliveau R. 2009. *BMC Cancer*, en révision.
- 4.4 **Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase phosphorylation blocks tumor progression in mice.**
Nyalendo C, Sartelet H, Gingras D, Béliveau R. 2009. *Cancer Biology and Therapy*, en révision.

4.1 Phosphorylation Src-dépendante de la MT1-MMP sur son résidu cytoplasmique tyrosine 573 : rôle dans la migration des cellules endothéliales et tumorales.

Résumé

La métalloprotéase matricielle de type membranaire 1 est une MMP transmembranaire qui joue des rôles importants dans les processus de migration cellulaire soutenant l'invasion tumorale et l'angiogenèse. En plus de son activité de dégradation de la matrice extracellulaire, la MT1-MMP possède également un court domaine cytoplasmique dont l'implication dans la locomotion cellulaire semble importante mais demeure peu comprise. Dans cette étude, nous montrons que la MT1-MMP est phosphorylée sur son unique résidu tyrosine situé dans sa séquence cytoplasmique (Tyr573) et que cette phosphorylation requiert la kinase Src. En utilisant des anticorps phosphospécifiques reconnaissant la MT1-MMP phosphorylée sur son résidu Tyr573, nous avons observé que la phosphorylation de l'enzyme est rapidement induite suite à une stimulation des cellules tumorales et endothéliales avec la sphingosine-1-phosphate (S1P), un chimioattracteur dérivé des plaquettes activées, suggérant un rôle dans la migration cellulaire déclenchée par ce lysophospholipide. En effet, la surexpression d'un mutant non phosphorylable de la MT1-MMP bloquait la migration des cellules HUVEC et HT-1080 induite par la S1P et était incapable de stimuler la migration des cellules n'exprimant pas l'enzyme (BAEC). Ensemble, ces résultats suggèrent fortement que la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine cytoplasmique et dépendante de la kinase Src joue un rôle clé dans la migration cellulaire et met l'accent sur l'importance du domaine cytoplasmique de l'enzyme dans ce processus.

**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION
D'UN ARTICLE DANS UNE THÈSE**

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Nous entérinons que Carine Nyalendo

est l'auteur principal de l'article intitulé :

Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration. Nyalendo C, Michaud M, Beaulieu E, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Béliveau R. 2007. *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p.15690-15699.

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse.

Co-auteur(s)

1) <u>Michaud, Marisol</u> Nom, prénom	<u>Marisol Michaud</u> Signature	<u>4/12/08</u> Date
2) <u>Beaulieu, Edith</u> Nom, prénom	<u>Edith Beaulieu</u> Signature	<u>3 déc. 08</u> Date
3) <u>Roghi, Christian</u> Nom, prénom	<u>Christian Roghi</u> Signature	<u>01/12/2008</u> Date
4) <u>Murphy, Gillian</u> Nom, prénom	<u>G Murphy</u> Signature	<u>01/12/08</u> Date
5) <u>Gingras, Denis</u> Nom, prénom	<u>Denis Gingras</u> Signature	<u>11/12/08</u> Date
6) <u>Béliveau, Richard</u> Nom, prénom	<u>Richard Béliveau</u> Signature	<u>12/12/08</u> Date

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

J'ai personnellement effectué la recherche bibliographique, la planification expérimentale, la réalisation des expériences et la rédaction du manuscrit. Marisol Michaud, une étudiante à la maîtrise, a participé à la réalisation des expériences présentées dans les figures 1A, 1B, 2A et 2B. La Dre Edith Beaulieu a participé à la réalisation de la figure 5. Les Dr Christian Roghi et Gilian Murphy ont fourni les mutants de la MT1-MMP.

Le Dr Denis Gingras est le superviseur du projet et a étroitement contribué à son élaboration et à la révision du manuscrit.

Le Dr Richard Béliveau est mon directeur de thèse. Il m'a guidé aux niveaux conceptuel et technique dans la réalisation du projet.

ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration.

soumis pour publication ☐, accepté pour publication ☐, ou publié ☒ dans : Journal of Biological Chemistry,

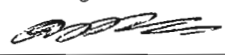
est : **Carine Nyalendo**

Auteur principal Nyalendo, Carine
Nom, Prénom


Signature

12/12/08
Date

Directeur de recherche Béliveau, Richard
Nom, Prénom


Signature

Date

*Manuscrit***4.1 Src-dependent phosphorylation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration***

Carine Nyalendo¹, Marisol Michaud¹, Edith Beaulieu¹, Christian Roghi^{2&}, Gilian Murphy^{2&},
 Denis Gingras¹ and Richard Béliveau¹

From the ¹Laboratoire de Médecine Moléculaire, Hôpital Ste-Justine-Université du Québec à Montréal, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, 3175 Chemin Côte-Ste-Catherine, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5, and ²Cancer Research UK, Cambridge Research Institute, Li Ka Shing Centre, Robinson Way, Cambridge, CB2 0RE, UK

Running title: Tyrosine phosphorylation of MT1-MMP

Address correspondance to : Richard Béliveau, Laboratoire de médecine moléculaire Ste-Justine-UQAM, Centre de cancérologie Charles-Bruneau, 3175, Chemin Côte-Ste-Catherine, Montréal, Québec (Canada) H3T 1C5, Phone: (514) 345-2366, FAX: (514) 345-2359, E-mail: molmed@recherche-ste-justine.qc.ca

Abstract

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)³ is a transmembrane MMP that plays important roles in migratory processes underlying tumor invasion and angiogenesis. In addition to its matrix-degrading activity, MT1-MMP also contains a short cytoplasmic domain whose involvement in cell locomotion seems important but remains poorly understood. In this study, we show that MT1-MMP is phosphorylated on the unique tyrosine residue located within this cytoplasmic sequence (Tyr573) and that this phosphorylation requires the kinase Src. Using phosphospecific antibodies recognizing MT1-MMP phosphorylated on Tyr573, we observed that tyrosine phosphorylation of the enzyme is rapidly induced upon stimulation of tumor and endothelial cells with the platelet-derived chemoattractant sphingosine-1-phosphate, suggesting a role in migration triggered by this lysophospholipid. Accordingly, overexpression of a non-phosphorylable MT1-MMP mutant (Y573F) blocked S1P-induced migration of HUVEC and HT-1080 cells and failed to stimulate migration of cells lacking the enzyme (BAEC). Altogether, these findings strongly suggest that the Src-dependent tyrosine phosphorylation of MT1-MMP plays a key role in cell migration and further emphasize the importance of the cytoplasmic domain of the enzyme in this process.

Introduction

The degradation of extracellular matrix (ECM) proteins by members of the matrix metalloproteinases (MMPs) plays a crucial role in several biological processes, including cell attachment, cell migration, invasiveness, cell proliferation, apoptosis and angiogenesis (Edwards et Murphy, 1998 ; Egeblad et Werb, 2002 ; Folgueras *et al.*, 2004 ; van Hinsbergh, Engelse et Quax, 2006). Among the various MMPs described to date, there is now considerable evidence that MMPs that are intrinsically associated with the plasma membrane due to presence of a transmembrane domain within their sequence, the so-called membrane-type MMPs, represent key components involved in pericellular proteolysis and subsequent cell locomotion and invasion (Haas, 2005 ; Itoh et Seiki, 2006). The prototypical member of this family, MT1-MMP, actively participates to the remodelling of the pericellular ECM by acting as a cellular receptor and activator of proMMP-2 (Sato *et al.*, 1994), and as a potent matrix-degrading protease that proteolyses a broad spectrum of ECM proteins (d'Ortho *et al.*, 1997 ; Hiraoka *et al.*, 1998 ; Pei et Weiss, 1996) as well as a number of cell surface-associated adhesion receptors (Belkin *et al.*, 2001 ; Kajita *et al.*, 2001). These events are likely to be important in vivo since MT1-MMP null mice fail to thrive and have a markedly reduced lifespan (Holmbeck *et al.*, 1999 ; Zhou *et al.*, 2000).

In addition to its role in normal physiology, MT1-MMP is also overexpressed in many types of tumors (Nakada *et al.*, 1999 ; Zhai *et al.*, 2005) and this overexpression appears crucial for tumor cell migration and invasion. For example, MT1-MMP-mediated degradation of some ECM proteins, such as the laminin-5 γ 2 chain (Koshikawa *et al.*, 2005), stimulates migration, while proteolysis of the dense, cross-linked meshwork of type I collagen fibrils by the enzyme confers neoplastic cells with tissue-invasive activity (Sabeih *et al.*, 2004) and sustains tumor cell growth in otherwise growth-restrictive three-dimensional matrices (Hotary *et al.*, 2003).

In spite of its importance to normal physiology and in the development of malignancy, the mechanisms underlying MT1-MMP-mediated cell invasion remain

incompletely understood. During cell migration, MT1-MMP localizes predominantly to the cell adherent edge at the migration front, an appropriate location for the degradation of the ECM barrier (Sato *et al.*, 1997). In addition, we and others have shown that MT1-MMP is preferentially localized into caveolae, specialized domains of the plasma membrane (Annabi *et al.*, 2001 ; Puyraimond *et al.*, 2001), and this localization may contribute to the spatiotemporal regulation of its proteolytic activity by controlling adequate endocytosis and recycling of the enzyme (Galvez *et al.*, 2004 ; Remacle, Murphy et Roghi, 2003).

In addition to the importance of MT1-MMP- mediated proteolytic breakdown of ECM proteins for the induction of cell migration, recent studies suggested that the cytoplasmic domain of the enzyme may also play a role in this process. For example, MT1-MMP mutants lacking the cytoplasmic domain remain localized at the cell surface and failed to induce migration, suggesting an important role of the enzyme cytoplasmic sequence in the regulation of its activity (Jiang *et al.*, 2001 ; Lehti *et al.*, 2000 ; Uekita *et al.*, 2001). In this respect, the cytoplasmic domain of MT1-MMP has been shown to be involved in several aspects of the enzyme's activity, including the formation of oligomers (Lehti *et al.*, 2002 ; Rozanov *et al.*, 2001), the localization of the enzyme to invadopodia (Nakahara *et al.*, 1997), the activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) signaling pathway (Gingras *et al.*, 2001) and in its interaction with a number of intracellular proteins such as cupin (Uekita *et al.*, 2004), the $\mu 2$ subunit of adaptor protein-2 (Uekita *et al.*, 2001) and tyrosine phosphorylated caveolin-1 (Labrecque *et al.*, 2004). Although the mechanisms by which the MT1-MMP cytoplasmic sequence is implicated in these processes remain poorly understood, recent observations indicate that it could involve an important function of this domain in the cooperation of the enzyme with serum-derived chemoattractant molecules such as sphingosine-1-phosphate (S1P), a bioactive lipid secreted by activated platelets (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004).

In this study, we report that MT1-MMP is tyrosine phosphorylated within its cytoplasmic domain, in a Src-dependent manner. This tyrosine phosphorylation is observable upon stimulation of endothelial and tumoral cells with S1P, and seems important for both tumor and endothelial cell migration.

Experimental procedures

Reagents and antibodies

Cell culture media, antibiotics (penicillin, streptomycin) and glutamine were purchased from Gibco (Grand Island, NY, USA). Trypsin was obtained from Sigma (St Louis, MO, USA). Basic-FGF was obtained from Upstate (Lake Placid, NY, USA). PolyFect and HiPerFect transfection reagents, control and caveolin-1 siRNAs were purchased from Qiagen (Mississauga, ON, Canada). The TransPass D₂ transfection reagent was from New England BioLabs Inc. (Ipswich, MA, USA). Antibodies against caveolin (610059, 610406) and caveolin pY14 (611338) were obtained from BD Transduction Laboratories (Mississauga, ON, Canada); anti-MT1-MMP (AB815 and MAB3328) were from Chemicon International (Temecula, CA, USA); anti-pTyr (pY99) and c-Myc (clone 9E10) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA); anti-Src (clone GD11) was from Upstate (Lake Placid, NY, USA). Mouse and rabbit HRP-conjugated secondary antibodies were purchased from Jackson ImmunoResearch (Mississauga, ON, Canada). Mouse Alexa488- (A21202) and rabbit rhodamine- (T2769) conjugated antibodies were from Molecular Probes (Invitrogen Canada, ON). Protein G- and A-coupled Sepharose, IPG strips and apparatus for isoelectric focusing (IEF) were from Amersham Biosciences AB (Uppsala, Sweden). Electrophoresis apparatus and reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON, Canada). PVDF transfer membranes and Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus were obtained from PerkinElmer Life Sciences (Boston, MA, USA).

Cell Culture

Bovine aortic endothelial cells (BAEC), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), human fibrosarcoma cells (HT-1080) and monkey kidney cells (COS-7) were purchased from Clonetics and were cultured at 37°C in a humidified atmosphere containing

5% CO₂. BAEC were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with low glucose supplemented with 10% bovine calf serum (BCS), 10 ng/ml b-FGF, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 4 mM glutamine. HUVEC were maintained in endothelial cell growth medium BulletKit (EGM-2) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS), human EGF (hEGF), hydrocortisone, VEGF, human basic-FGF (hFGF-B), IGF-1, ascorbic acid, heparin, gentamycin, and amphotericin-B. HT-1080 were grown in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 1 mM pyruvate, 10% FBS, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 4 mM glutamine. COS-7 were grown in DMEM with high glucose supplemented with 10% FBS, 100 IU/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 4 mM glutamine.

Transfection

The cDNAs encoding the full-length human MT1-MMP, its cytoplasmic domain-deleted (CA20) and catalytically inactive (E240A) mutants have been previously described (31, 34). The MT1-MMP cytoplasmic mutants LLY⁵⁷¹⁻⁵⁷³AAA and Y573F were produced by site-directed mutagenesis, as previously described (Labrecque *et al.*, 2004). The myc-tagged full-length MT1-MMP (mycMT1), in which the myc epitope was inserted in the hinge region of the enzyme between proline 312 and threonine 313 (PEQKLISEEDLT) was synthesized using the overlap extension method. The wild-type and dominant-negative Src plasmids were kindly provided by Dr. Isabelle Royal (Université de Montréal, Canada). Transient transfection of COS-7 cells was performed using the PolyFect transfection reagent (Qiagen). HT-1080 cells were transiently transfected using the Fugene6 transfection reagent (Roche). HUVEC and BAEC were transiently transfected with TransPass D2 transfection reagent (BioLabs). All transfections were performed according to the manufacturer's instructions.

Production of phospho-MT1-MMP(Y573) antibodies

Polyclonal phosphospecific antibodies were produced by 21st Century Biochemicals (Marlboro, MA, USA). Briefly, antigenic phosphopeptide (GTPRRLL[pY]CQRSL-amide) and nonphosphopeptide (GTPRRLLYCQRSL-amide) were synthesized based on the human MT1-MMP cytoplasmic sequence and purified by HPLC. Sequences were verified by mass spectrometry. Rabbits were inoculated 5 times with the phosphopeptide conjugated with a immune carrier and serum was collected and subjected to affinity depletion using the nonphosphopeptide, followed by affinity purification using a phosphopeptide affinity column. To verify the specificity of the antibodies against the phosphorylated peptide, pMT1-MMP(Y573) antibodies were pre-incubated for 45 min at 37°C with a 5-fold molar excess of either the phosphopeptide or the nonphosphopeptide and immunodetection was performed as described below.

Two-dimensional gel electrophoresis

For the first dimension, immunoprecipitates bound to protein A-coupled Sepharose beads were solubilized in rehydration buffer (5 M urea, 2 M thiourea, 2 % CHAPS, 2 % SB3-10, 0.3 % DTT, bromophenol blue) containing ampholytes (pH 4-7). Solubilized proteins were incubated with 7 cm-IPG strips containing a linear pH gradient (4-7) (Amersham Biosciences) at room temperature for 10 h, and isoelectric focusing (IEF) was performed at 500 V for 30 min, 1000 V for 30 min followed by 5000 V for 13 h. For the second dimension, IPG strips were incubated for 15 min at room temperature in equilibration buffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 6 M urea, 30 % glycerol, 2 % SDS) containing 2 % DTT, and then for 15 min in equilibration buffer containing 5 % iodoacetamide and bromophenol blue. IPG strips were loaded on 7.5 % SDS-PAGE and Western blotting was performed as described below.

Caveolae Isolation

Caveolae were purified using a hyperosmotic carbonate method, as described previously (Labrecque *et al.*, 2004). Briefly, confluent COS-7 cells cultured in 100-mm² dishes were scraped into 3 ml of 0.5 M sodium carbonate (pH 11) and homogenized extensively using a Polytron (three pulses of 15 sec, at speed 4) followed by sonication (five pulses 15 sec, at 70% of maximal power). 2.5 ml of the resulting homogenate was brought to 45% sucrose by the addition of 2.5 ml of 90% sucrose in MES-buffered saline (MBS; 25 mM MES pH 6.5, 150 mM NaCl) and overlaid with two layers (6 ml each) of 35 and 5% sucrose in MBS containing 0.25 M carbonate. The gradient was then centrifuged at 200,000 x g for 18 h using a Beckman SW41Ti rotor. For analysis of the resulting gradient, 1 ml fractions were collected from the top to the bottom of the gradient. Caveolae-enriched (5 to 8) or non-caveolae (12 to 15) fractions were pooled, diluted in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), and centrifuged at 100,000 x g for 1 h.

Stimulation of HT1080 and HUVEC cells with SIP

HT1080 and HUVEC cells grown to 90% confluence were serum-starved for 18 h in medium containing 0.5% serum. Cells were then pre-incubated 2 h at 37°C with 1 μ M PP2 (or equivalent amount of vehicle), followed by incubation for 2 to 30 min with 1 μ M SIP. Cells were then solubilized in SDS lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1% SDS, 1 mM sodium orthovanadate), followed by boiling for 5 min at 100°C and homogenization using a 26-gauge needle. Protein concentrations were determined by the bicinchoninic acid method (Pierce).

Immunoprecipitation and Western Blotting

Procedures have been described elsewhere (Labrecque *et al.*, 2004). Briefly, equal amounts of proteins were incubated in lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.5% NP-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM sodium vanadate) overnight at 4°C in the presence of 1–2 µg/mL of specific antibodies and the immune complexes were collected by incubating the mixtures with protein A or G-coupled Sepharose beads. Bound material was solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 5 min, and separated by SDS-PAGE. The proteins were transferred onto PVDF membranes, blocked overnight at 4°C with TBST buffer containing 3% BSA, and incubated for 1 h at room temperature with the desired primary antibodies. Immunoreactive bands were revealed following one hour incubation with HRP-conjugated anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies, and the signals were visualized by chemiluminescence.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Endothelial cells (HUVEC) were plated on cover glasses coated with 10 µg/mL fibronectin, serum starved, and treated (or not) with 1 µM SIP for 15 min. After 5 min of incubation with Hoechst 20 µM for nuclei staining, cells were fixed with 3.7% formaldehyde for 15 min, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min, blocked (1% BSA in Tris Buffer Saline containing 0.1% Tween) for 30 min and stained with specific primary antibodies against phosphoMT1-MMP (1/50 dilution), phospho-caveolin-1 and MT1-MMP (1/100 dilution). Cells were incubated with Alexa488- or rhodamine-conjugated secondary antibodies. Slides were mounted with Immuno-Fluore Mounting Medium (MP Biomedicals). Immunostaining was visualized and photographed using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

Cell migration

Migration assays of BAEC, HUVEC or HT1080 cells transfected with either pcDNA3.1, WT or Y573F forms of MT1-MMP, were performed on transwells precoated with 10 $\mu\text{g/mL}$ fibronectin. The transwells were assembled in 24-well plates and the lower chambers filled with serum-free media with or without 1 μM S1P or 10 % FBS. Transfected cells were harvested, resuspended in 100 μL of fresh cell media at a density of 5×10^5 cells/mL and inoculated into the upper chamber of each transwell. The plates were then placed at 37°C in 5% CO_2 /95% air for 3 h and cells that had migrated were quantified using computer-assisted imaging (Northern Eclipse 6.0; Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada). Data are expressed as the average density of migrated cells per 4 fields (original magnification 50 X). Statistical analysis was performed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-tests. $P < 0.05$ was considered statistically significant. For transfection efficiencies measurement, total membranes were isolated as described (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004) and MT1-MMP was immunodetected (HUVEC and BAEC). For HT-1080 cells, transfection efficiencies were achieved by MT1-MMP-dependent activation of MMP-2 in zymography as described (Annabi *et al.*, 2001).

Results

MT1-MMP is phosphorylated on cytoplasmic tyrosine 573: involvement of Src kinase

We previously showed that overexpression of Src induces the tyrosine phosphorylation of caveolin-1 and its subsequent association with MT1-MMP (Labrecque *et al.*, 2004). Since this interaction required the cytoplasmic domain of MT1-MMP, we hypothesized that the stimulatory effect of Src could also involve the phosphorylation of the unique tyrosine residue located in the cytoplasmic sequence of MT1-MMP. As a first step to examine this possibility, COS-7 cells were transiently transfected with a myc-tagged version of MT1-MMP along with Src or a kinase-inactive dominant-negative form of Src (Src DN). mycMT1 was immunoprecipitated using an anti-myc monoclonal antibody and the extent of tyrosine phosphorylation was determined by immunoblotting using an anti-phosphotyrosine antibody. As shown in Fig. 1A, immunoprecipitation of MT1-MMP from cells overexpressing MT1-MMP and Src resulted in the appearance of tyrosine phosphorylated bands in the 63-66 kDa range, whereas co-expression of MT1-MMP with an inactive Src mutant failed to induce the tyrosine phosphorylation of these proteins. The 64 kDa phosphorylated band shows an electrophoretic mobility similar to that of myc-tagged MT1-MMP and was also observed upon reverse immunoprecipitation with anti-phosphotyrosine antibody, strongly suggesting that it represents a tyrosine phosphorylated form of MT1-MMP.

In order to further establish if MT1-MMP is indeed tyrosine phosphorylated in Src-expressing cells and whether this phosphorylation occurs at an intracellular location, we next examined the effect of various mutants of the enzyme on this event. As shown in Fig. 1B, immunoprecipitation of both myc-tagged (mycMT1) or wild-type MT1-MMP (WT) resulted in the appearance of tyrosine phosphorylated bands corresponding to the molecular weights of both forms of the enzyme, indicating that the observed phosphorylation was not restricted to the epitope-tagged version of MT1-MMP. We next examined the requirement for the catalytic activity and cytoplasmic sequence of the enzyme using various mutants. The catalytically-inactive mutant (E240A) remained phosphorylated, but in a lower extent than

the wild-type enzyme (WT). The E240A mutation could have induced a global conformational change in the enzyme structure since this mutation impairs the refolding of a recombinant MT1-MMP polypeptide (Follows *et al.*, 2001); thus preventing partially MT1-MMP tyrosine phosphorylation. However, removal of the cytoplasmic domain (CΔ20) decreased almost completely tyrosine phosphorylation (Fig. 1B).

Since the MT1-MMP cytoplasmic sequence contains only one tyrosine residue at position 573 of the protein, we next examined the effect of mutated versions of MT1-MMP lacking this residue. Interestingly, overexpression of the Y573F and LLY⁵⁷¹⁻⁵⁷³AAA mutants abolished tyrosine phosphorylation, further suggesting that the intracellular tyrosine residue of MT1-MMP is the site of phosphorylation (Fig. 1B).

To unambiguously establish that MT1-MMP is phosphorylated on tyrosine 573, we next analyzed, by two-dimensional (2D) gel electrophoresis, immunoprecipitates from cells expressing MT1-MMP or MT1-MMP along with Src. As shown in Fig. 1C, immunoprecipitation of MT1-MMP from cells co-expressing Src resulted in the appearance of at least 4 well-defined tyrosine phosphorylated spots (vertical arrows). We observed that the more acidic forms migrated at a position identical to immunoreactive MT1-MMP (63 kDa) (horizontal arrow) whereas the more basic forms, with slightly lower molecular weights (60 kDa), were not associated with detectable levels of the enzyme. This suggests that only a slight portion of the 63 kDa forms is phosphorylated, while the majority of the 60 kDa forms are; highlighting that the 60 kDa forms are less abundant than the 63 kDa ones. This is supported by the observation that overexpression of the MT1-MMP (Y573F) mutant completely abolished the tyrosine phosphorylation of all MT1-MMP isoforms (Fig. 1C). Overall, these results indicate that MT1-MMP is tyrosine phosphorylated in Src-expressing cells and that this event involves its unique cytoplasmic tyrosine 573 residue.

Caveolin-1 and caveolae are not necessary for MT1-MMP phosphorylation

We next examined whether the tyrosine phosphorylation of MT1-MMP is involved in the interaction of the enzyme with tyrosine phosphorylated caveolin-1, since we have previously shown that caveolin-1 interact with MT1-MMP via its cytoplasmic domain (Labrecque *et al.*, 2004). First, COS-7 cells were transfected with either wild-type MT1-MMP or the non-phosphorylatable MT1-MMP mutant (Y573F) and the presence of MT-MMP in the caveolin-1 immunoprecipitates was determined. As shown in Fig. 2A, both the wild-type or the mutated version MT1-MMP associated with caveolin-1, ruling out phosphorylation of MT1-MMP as a necessary event for its interaction with caveolin-1.

Numerous proteins, such as endothelial nitric oxide synthase (eNOS) or epidermal growth factor receptor (EGFR), are regulated by an interaction with caveolin-1 (Wu *et al.*, 2005). We thus hypothesized, since MT1-MMP interact with caveolin-1, its phosphorylation could be regulated by caveolin-1. To determine if caveolin-1 is necessary for the tyrosine phosphorylation of MT1-MMP, cells overexpressing MT1-MMP and Src were incubated with a siRNA specifically targeting caveolin-1 and the resulting phosphorylation of MT1-MMP was monitored by immunoprecipitation. As shown in Fig. 2B, in spite of a dramatic reduction of the caveolin-1 levels by the siRNA, the tyrosine phosphorylation of MT1-MMP was not markedly affected by the treatment. However, we routinely observed that down regulation of caveolin-1 significantly increases both MT1-MMP levels and its extent of phosphorylation, suggesting that caveolin-1 may play a role in the turnover rate of the enzyme. This effect is however unlikely to be related to the disruption of caveolae that are induced by the reduced levels of caveolin-1 since the addition of β -cyclodextrin, a well-described caveolae-disrupting agent, had no significant effect on either MT1-MMP expression or phosphorylation (Fig. 2B). Finally, we tested whether phosphorylation of MT1-MMP could alter its localization to caveolae. Although overexpression of MT1-MMP in COS-7 cells leads to a lower caveolar localization of the enzyme than in tumor (Annabi *et al.*, 2001) or endothelial (Puyraimond *et al.*, 2001) cells, we observed that the proportion of the enzyme associated with these domains was not significantly affected by either overexpression

of Src or by mutation of the phosphorylation site within the cytoplasmic domain (Fig. 2C). Overall, these results indicate that caveolae and caveolin-1 are not involved in the tyrosine phosphorylation of MT1-MMP.

Production of phosphospecific antibodies against tyrosine phosphorylated MT1-MMP

Phosphospecific antibodies represent an invaluable tool to study the role of phosphorylation in signal transduction events (Mandell, 2003). In order to generate antibodies recognizing the phosphorylated form of MT1-MMP, rabbits were immunized with a synthetic phosphopeptide encompassing the phosphorylated sequence of the enzyme and the resulting antibodies were obtained by affinity depletion using a nonphosphopeptide, followed by affinity purification (Fig. 3A). To verify the specificity of the antibody towards phosphorylated MT1-MMP, antibodies were preincubated with either the nonphosphopeptide or the phosphopeptide and their capacity to recognize phosphorylated MT1-MMP was evaluated (Fig. 3B). As expected, the phosphopeptide completely abolished the immunodetection of the Src-induced phosphorylated form of MT1-MMP whereas preincubation of the antibodies with the nonphosphopeptide had no effects. Furthermore, the anti-phosphoMT1-MMP(Y573) antibodies recognize MT1-MMP only in immunoprecipitates from COS-7 cells co-expressing MT1-MMP and Src, in agreement with previous results obtained with the anti-phosphotyrosine antibody. However, the antibodies did not recognize the MT1-MMP (Y573F) mutant, even in the presence of Src, further confirming their specificity towards MT1-MMP that is tyrosine phosphorylated at its cytoplasmic tyrosine residue (Fig. 3C). Finally, the pattern of MT1-MMP phosphorylation detected by the phosphospecific antibodies following 2D electrophoresis was similar to that observed using the anti-phosphotyrosine antibody, again indicating that these antibodies indeed recognize phosphorylated MT1-MMP (Fig. 3D). MT1-MMP phosphospecific antibodies were also validated for immunocytochemistry and confocal microscopy. As shown in (Fig. 3E) phosphorylated MT1-MMP and MT1-MMP have the same pattern, and colocalized, validating by another way the MT1-MMP phosphospecific antibodies.

Sphingosine-1-phosphate (S1P) stimulates endogenous endothelial and tumor cells MT1-MMP phosphorylation

S1P is a platelet-derived lysophospholipid that acts as a powerful chemoattractant and that plays an important role in angiogenesis (Razani, Woodman et Lisanti, 2002). Previous work from our laboratory has demonstrated that MT1-MMP cooperates with S1P to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004). In order to examine whether MT1-MMP is tyrosine phosphorylated in response to S1P stimulation, human fibrosarcoma (HT-1080) and human umbilical endothelial vein (HUVEC) cells were incubated for various periods of time with S1P and the extent of MT1-MMP phosphorylation was monitored by immunoprecipitation. Since preliminary experiments indicated that the phosphospecific antibodies were ineffective in immunoprecipitation procedures (result not shown) and that anti-MT1-MMP antibodies failed to precipitate the enzyme from untransfected cells (Labrecque *et al.*, 2004), total phosphotyrosines were immunoprecipitated and the presence of phosphorylated MT1-MMP in the immune complexes was monitored using the anti-phosphoMT1-MMP(Y573) antibodies. As shown in Fig. 4A, stimulation of HT1080 cells with S1P resulted in a time-dependent appearance of tyrosine phosphorylated MT1-MMP, maximal phosphorylation occurring at 15 min. Tyrosine phosphorylation was predominantly observed for the 63-kDa form of the enzyme but a 57 kDa-form of MT1-MMP was also strongly phosphorylated after 2 min of stimulation with S1P. The extent of phosphorylation of this form however rapidly declined, possibly reflecting the high turnover rate of MT1-MMP in these cells (Koo *et al.*, 2002). Addition of PP2, a Src kinase inhibitor, markedly inhibited S1P-dependent phosphorylation of MT1-MMP, again suggesting the importance of Src in this process. In a similar manner, S1P stimulates MT1-MMP phosphorylation in HUVEC, with a maximum at 5 min and this phosphorylation was sensitive to PP2, indicating the involvement of Src kinase activity.

Since MT1-MMP is localized in caveolae and interacts with phosphorylated caveolin-1 (Fig. 2D; (Annabi *et al.*, 2001 ; Labrecque *et al.*, 2004)), we have examined the

effect of SIP-dependent phosphorylation of MT1-MMP on its subcellular localization in HUVEC. Interestingly, SIP induce re-localization of MT1-MMP and its phosphorylated form from the interior of the cell to the membrane. (Fig. 4C-F). This re-localization was correlated with a partial colocalization of MT1-MMP and phosphoMT1-MMP with phosphocaveolin-1.

MT1-MMP phosphorylation is important for tumor and endothelial cell migration

It is well established that MT1-MMP plays a key role in cell migration (reviewed in (Itoh et Seiki, 2006)). To assess the role of phosphorylated MT1-MMP in tumor and endothelial cell migration, fibrosarcoma (HT-1080) or endothelial (HUVEC and BAEC) cells were transfected with either WT or Y573F forms of MT1-MMP. In cells which express relatively high levels of endogenous MT1-MMP (HUVEC and HT-1080), overexpression of WT had a modest stimulatory effect on migration but the Y573F mutant strongly diminished migration induced by either SIP or serum, suggesting that the mutant acted in a dominant-negative manner (Fig. 5A and B). As reported previously (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004), overexpression of MT1-MMP in BAEC, which are largely devoid of the enzyme, induced a marked increase in migration induced by either SIP or serum (Fig. 5C). However, this stimulatory effect was markedly reduced upon expression of the non-phosphorylatable MT1-MMP mutant. These results thus indicate that the tyrosine residue located within the MT1-MMP cytoplasmic domain plays an important role in cell migration, possibly by acting as a tyrosine phosphorylation site within the enzyme.

Discussion

Although the involvement of MT1-MMP in cell migration has been mostly studied in terms of its proteolytic activity towards a wide variety of ECM (Hiraoka *et al.*, 1998 ; Hotary *et al.*, 2003 ; Koshikawa *et al.*, 2005 ; Sabeh *et al.*, 2004) or cell surface-associated (Belkin *et al.*, 2001 ; Kajita *et al.*, 2001) proteins, there is also increasing evidence supporting an important role of the short intracellular cytoplasmic domain of the enzyme in this event. For example, the migration of a number of tumor (Gingras *et al.*, 2001 ; Lehti *et al.*, 2000 ; Rozanov *et al.*, 2001 ; Uekita *et al.*, 2001) or endothelial (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004) cell lines is impaired following deletion of the intracellular sequence of MT1-MMP, an inhibitory effect that may be related to defective endocytosis of the protein (Uekita *et al.*, 2001), reduced activation of the ERK signaling cascade (Gingras *et al.*, 2001) as well as impaired interaction of the enzyme with tyrosine phosphorylated caveolin-1 (Labrecque *et al.*, 2004).

The results reported in the current work suggest that the importance of the cytoplasmic domain in MT1-MMP-dependent cell migration may also be related to the phosphorylation of the unique tyrosine residue located within this intracellular domain. First, we observed that tyrosine phosphorylated proteins associated with the MT1-MMP immunoprecipitates had molecular weights and isoelectric points very similar to the enzyme, strongly suggesting that they indeed represent phosphorylated forms of MT1-MMP. This was supported by the inhibition of phosphorylation by site-directed mutagenesis of this tyrosine residue as well as by the specific recognition of the phosphorylated forms of the enzyme by phosphospecific antibodies raised against the phosphorylated sequence. Since these antibodies did not recognize MT1-MMP lacking a single tyrosine residue located within its intracellular domain, these observations clearly indicate that, at least under the experimental conditions used in our study, MT1-MMP was phosphorylated on its unique cytoplasmic tyrosine residue.

The tyrosine phosphorylation of MT1-MMP required concomitant expression of Src and was completely abolished by overexpression of a kinase-defective Src mutant, indicating that Src and/or a kinase activated by Src plays an essential role in this event. Although under these conditions, Src also induced phosphorylation of caveolin-1, leading to the interaction of MT1-MMP with phosphocaveolin-1 (Fig. 2; (Labrecque *et al.*, 2004)), our results indicate that this interaction was neither necessary for, nor a consequence of the phosphorylation of MT1-MMP. However, we observed that reduction of caveolin-1 levels increased the expression and the extent of phosphorylation of MT1-MMP, suggesting that caveolin-1 may regulate the turnover of the enzyme.

Interestingly, tyrosine phosphorylation of MT1-MMP was not restricted to cells overexpressing Src but could also be detected in untransfected cells stimulated with the chemoattractant SIP, where phospho-MT1-MMP is re-localized in membrane domains, raising the interesting possibility that this phosphorylation could participate to the migratory processes induced by this lipid. Such an involvement is strongly suggested by the ability of a non-phosphorylatable MT1-MMP mutant to inhibit migration of cells endogenously expressing MT1-MMP, such as HT1080 and HUVEC, as well as by its failure to stimulate migration in BAEC, a cell line that express much lower levels of the enzyme. This SIP-dependent tyrosine phosphorylation of MT1-MMP could thus explain the preferential cooperation of the enzyme with this lipid for the induction of migration and morphogenic differentiation of endothelial cells (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004) and the absence of promigratory effects of SIP in cells lacking MT1-MMP (Pilorget *et al.*, 2005).

Phosphorylation of tyrosine 573 within the MT1-MMP intracellular domain was unexpected since this region lacks known recognition motifs for tyrosine kinases (R/K/Q) X_{2-4} (D/E) X_{2-3} pY (Wu, Ma et Lam, 1994) or binding motifs for either Src homology 2 (SH2) (pYXX(I/L)) or SH3 (PXXP) domains that would facilitate recruitment of tyrosine kinases. In spite of the lack of these consensus sequences known to be involved in signal transduction, previous results have nevertheless suggested that the sequence encompassing this tyrosine

residue plays an important role in MT1-MMP function. The LLY sequence was found to be essential for internalization of the enzyme at the migration front through its involvement in the interaction of MT1-MMP with the adaptor 2 complex (Uekita *et al.*, 2001), suggesting that reversible phosphorylation of this tyrosine residue may play a role in this interaction. In this respect, it is noteworthy that the internalization of the T cell surface receptor CTLA-4 from the plasma membrane involves the interaction of the receptor cytoplasmic sequence ¹⁶⁵YVKM¹⁶⁸ with the adaptor complex μ 2 and that phosphorylation of the tyrosine residue abolishes this binding, possibly by disrupting the hydrophobic pocket necessary for the interaction (Follows *et al.*, 2001 ; Shiratori *et al.*, 1997). Such a negative regulatory role of phosphorylation on the endocytosis of MT1-MMP is also suggested by the recent observation that v-Src-transformed cells activate a FAK-dependent mechanism that reduces endocytosis of MT1-MMP, increasing cell-surface expression of the enzyme and the resulting degradation of the ECM (Wu *et al.*, 2005). Based on our observation that MT1-MMP is tyrosine phosphorylated and that a non-phosphorylatable mutant of the enzyme inhibited cell migration, it is thus tempting to speculate that the induction of MT1-MMP-dependent migration by chemoattractants such as S1P could involve tyrosine phosphorylation of the enzyme, leading to alteration in its rate of internalization and in the resulting increase in ECM degradation and migration. Further studies on the impact of tyrosine phosphorylation of MT1-MMP on its rate of internalization are currently underway and should provide interesting insights on the role of this event in the regulation of the function of the enzyme.

Although the important role of MT1-MMP in tumor invasion and angiogenesis makes it an attractive drug target, the participation of the enzyme to normal skeletal development suggest that the inhibition of its catalytic activity may lead to severe side effects (Overall et Kleinfeld, 2006). In this context, the observation that tyrosine phosphorylation of the MT1-MMP cytoplasmic domain plays an important role in both tumor and endothelial cell migration suggests that interfering with the intracellular pathways involved in this event may represent an alternative strategy to inhibit tumor progression triggered by this crucial enzyme.

References

Voir page 180.

Footnotes

We thank Marguerite Buchanan for her helpful advices on 2D gel electrophoresis, and Marco Di Falco for his critical analysis of mass spectrometry study.

*This work is supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research to Richard Béliveau and Denis Gingras.

&GM and CR are supported by Cancer Research UK

³The abbreviations used are: MT1-MMP, membrane-type matrix metalloproteinase; ECM, extracellular matrix; S1P, sphingosine-1-phosphate; ERK, extracellular-related kinase; basic-FGF, basic fibroblast growth factor; siRNA, small interfering RNA; IEF, isoelectric focusing; BAEC, bovine aortic endothelial cells; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; HT-1080, human fibrosarcoma cells; COS-7, monkey kidney cells; FBS, fetal bovine serum; 2D electrophoresis, two-dimensional electrophoresis; Src DN, Src dominant-negative; SH2-3; Src homology domain 2-3.

Figure legends

Figure 1. MT1-MMP is phosphorylated on its cytoplasmic tyrosine residue 573. *A*, COS-7 cells were transfected with empty vector (pcDNA3.1), wild-type myc-tagged MT1-MMP (mycMT1), Src or Src dominant-negative (Src DN). 48 h post-transfection, cell lysates were subjected to immunoprecipitation (IP) with a monoclonal antibody raised against either myc-tag or total phosphotyrosines (pTyr), and phosphorylation was monitored by Western blotting. Transfected proteins levels were monitored in cell lysates by Western blotting using specific antibodies. *B*, COS-7 cells were transfected with Src and different versions of MT1-MMP (myc-tagged (mycMT1), wild-type (WT), catalytically inactive mutant (E240A), cytoplasmic domain-deleted (CA20), or cytoplasmic mutants Y573F and LLY⁵⁷¹⁻⁵⁷³AAA), and the extent of MT1-MMP phosphorylation was monitored as in *A*. *C*, COS-7 cells were transfected with Src along with WT or Y573F forms of MT1-MMP. 48 h post-transfection, cell lysates were immunoprecipitated with polyclonal antibodies raised against MT1-MMP. MT1-MMP phosphorylation was analyzed by 2D gel electrophoresis: immunoprecipitated proteins were first subjected to isoelectric focusing (IEF) in a pI range 4 to 7, and then applied to a 7.5% SDS-PAGE. 2D gels electrophoresis were then immunoblotted with antibodies against either pTyr or MT1-MMP. ID, immuno-detection; NS, non specific; H, immunoglobulin heavy-chain. These results are representative of 3 distinct experiments.

Figure 2. Caveolin-1 and caveolae are not necessary for MT1-MMP phosphorylation. *A*, COS-7 cells were transfected with Src and either mycMT1, WT or Y573F forms of MT1-MMP. 48h post-transfection, cell lysates were immunoprecipitated with a monoclonal antibody raised against caveolin-1 (Cav-1), and associated MT1-MMP was detected with an anti-MT1-MMP. Transfected proteins levels were monitored in lysates by Western blotting using specific antibodies. *B*, COS-7 cells were transfected with control and caveolin-1 siRNA, followed, 24h later, by transfection with mycMT1 and Src. Cells were then treated for 2 h with β -cyclodextrin as indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with a monoclonal antibody raised against myc, and total phosphotyrosines were detected with an anti pTyr. Transfected proteins levels were monitored by Western blotting using specific

antibodies. *C*, COS-7 cells were transfected with Src and either pcDNA3.1, WT or Y573F forms of MT1-MMP. 48 h post-transfection, cells were harvested and subjected to sucrose gradient sedimentation. Equal amount proteins from caveolae (c) and non-caveolae (nc) were subjected to immunoblotting with the indicated antibodies. ID, immuno-detection; NS, non specific; H, immunoglobulin heavy-chain. These results are representative of 4 distinct experiments.

Figure 3. Generation of polyclonal phosphospecific antibodies against MT1-MMP phosphorylated on tyrosine 573. *A*, Amino acid sequences of peptides used for rabbit immunisation and affinity depletion. *B*, Validation of antibody phosphospecificity. COS-7 cells were transfected with WT form of MT1-MMP and Src, and 48h post-transfection, cell lysates were subjected to immunoprecipitation using polyclonal antibodies raised against MT1-MMP. Before immunoblotting, pMT1-MMP (Y573) antibodies were pre-incubated in the absence (a) or in the presence of a 5-fold molar excess of either the nonphosphopeptide (b), or the phosphopeptide (c). The blotting membrane was then reprobed with anti-MT1-MMP antibodies (d). *C*, COS-7 cells were transfected with Src, and either WT or Y573F forms of MT1-MMP. 48 h post-transfection, cell lysates were immunoprecipitated with anti-MT1-MMP or anti-phosphotyrosine (pTyr) antibodies. Phosphorylated MT1-MMP was detected with either pTyr or pMT1-MMP(Y573) antibodies by Western blotting. *D*, COS-7 cells were transfected with WT form of MT1-MMP, in the presence or in the absence of Src, and 48 h post-transfection cell lysates were immunoprecipitated with polyclonal antibodies against MT1-MMP. MT1-MMP phosphorylation was analysed by 2D gel electrophoresis, followed by immunoblotting with anti- phosphoMT1-MMP (Y573) antibodies. ID, immuno-detection; NS, non specific; H, immunoglobulin heavy-chain. *E*, HUVECs were seeded on fibronectin-coated coverslips, serum-starved and stimulated with sphingosine-1-phosphate (S1P). Nuclei were then stained with Hoechst, fixed and double stained with specific antibodies against MT1-MMP (MAB3328) and pMT1-MMP(Y573) followed by Alexa-488- and rhodamine- conjugated secondary antibodies, respectively. Representative cell images were collected by confocal microscopy as described in *Experimental procedures* section. The white scale bar represents 10 μ m. These results are representative of 3 distinct experiments.

Figure 4. S1P-dependent phosphorylation of MT1-MMP in fibrosarcoma and endothelial cells. HT-1080 fibrosarcoma (A) or HUVEC endothelial (B) cells were serum-starved (1 % serum) for 18 h. Cells were pre-treated for 2 h with 1 μ M PP2 or equivalent amount of vehicle (DMSO) and stimulated with 1 μ M S1P for the indicated periods of time. Cells were harvested and immunoprecipitated with a monoclonal antibody raised against pTyr. Phosphorylated MT1-MMP was immunodetected with anti-pMT1-MMP(Y573) antibodies. ID, immuno-detection; NS, non specific; H, immunoglobulin heavy-chain. HUVECs were seeded on fibronectin-coated coverslips, serum-starved and stimulated (D and F) or not (C and E) with sphingosine-1-phosphate (S1P). Nuclei were then stained with Hoechst, fixed and double stained with specific antibodies against phosphocaveolin-1 (pCav-1) and pMT1-MMP(Y573) (C and D), or double stained with anti-pCav-1 and anti-MT1-MMP (AB815) (E and F), followed by Alexa-488- and rhodamine- conjugated secondary antibodies, respectively. Representative cell images were collected by confocal microscopy as described in *Experimental procedures* section. The white scale bar represents 10 μ m. These results are representative of 3 distinct experiments.

Figure 5. Mutation of cytoplasmic tyrosine 573 of MT1-MMP impairs tumor and endothelial cell migration. HT-1080, HUVEC and BAEC were transfected with either pcDNA3.1, WT or Y573F forms of MT1-MMP. 48 h post-transfection, cells were harvested, $5 \cdot 10^4$ cells were subjected to migration assays as described in the *Experimental procedures* section, using transwells precoated with 10 μ g/mL fibronectin and 1 μ M S1P or 10% foetal bovine serum (FBS) as chemoattractants. Values (means \pm SD) are expressed relatively to control cells (n=3 for HT-1080, n=4 for HUVEC and BAEC). Statistical analyses were performed with ANOVA (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). Remaining cells and conditioned media were used for the evaluation of transfection efficiencies (right panels). Briefly, MT1-MMP expression in transfected cells was monitored by western blotting of total membranes, and by MT1-MMP-dependent activation of MMP-2 (zymography). ID, immuno-detection; NS, non specific.

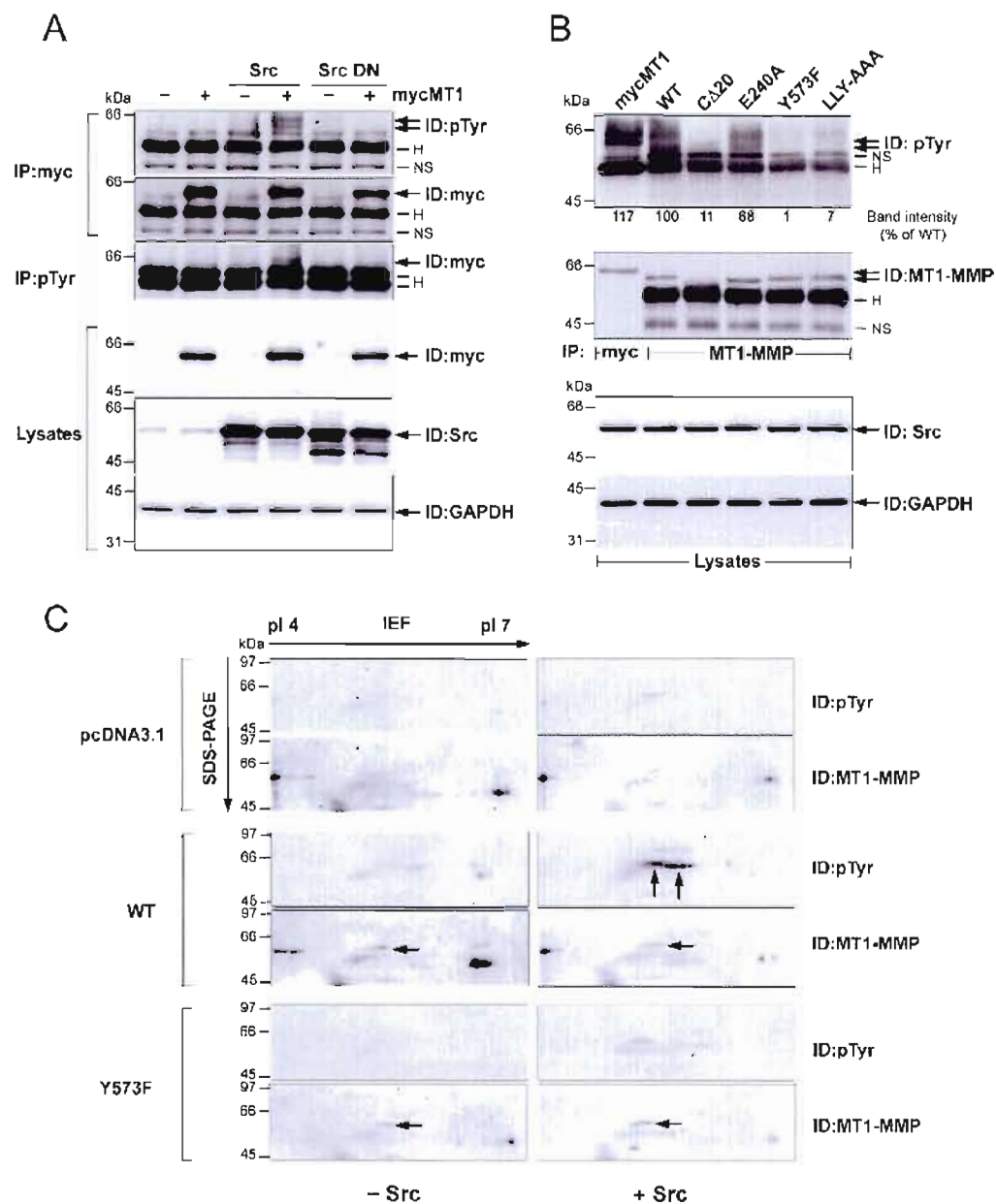


Figure 1. MT1-MMP is phosphorylated on its cytoplasmic tyrosine residue 573.

Nyalendo *et al.*, 2007. *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p.15690-15699.

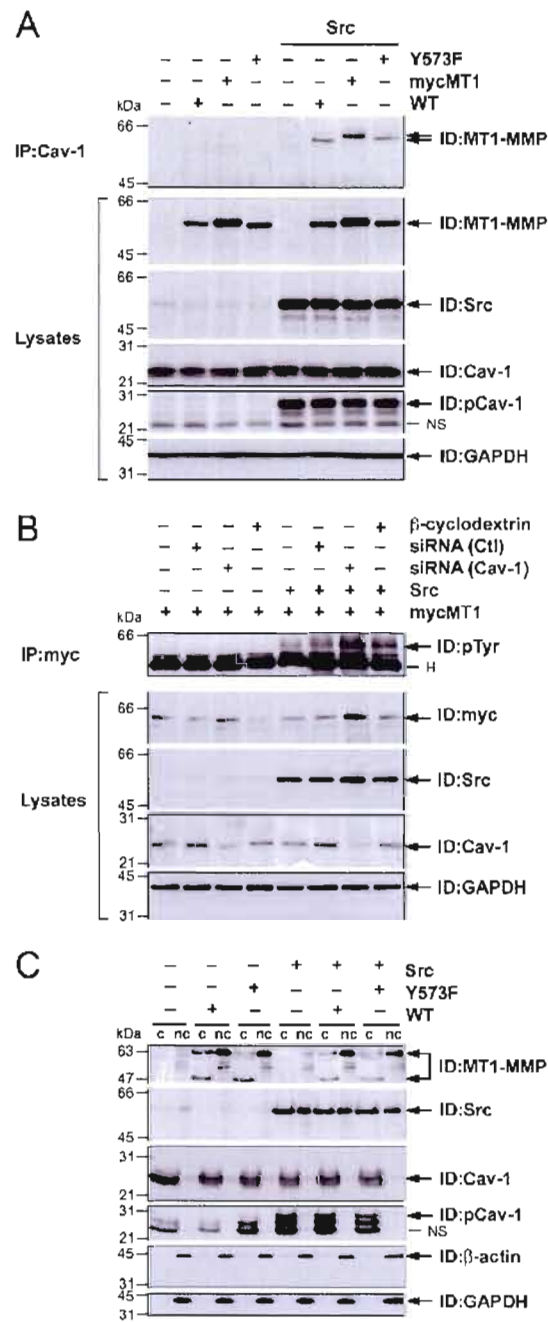


Figure 2. Caveolin-1 and caveolae are not necessary for MT1-MMP phosphorylation. Nyalendo *et al.*, 2007. *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p.15690-15699.

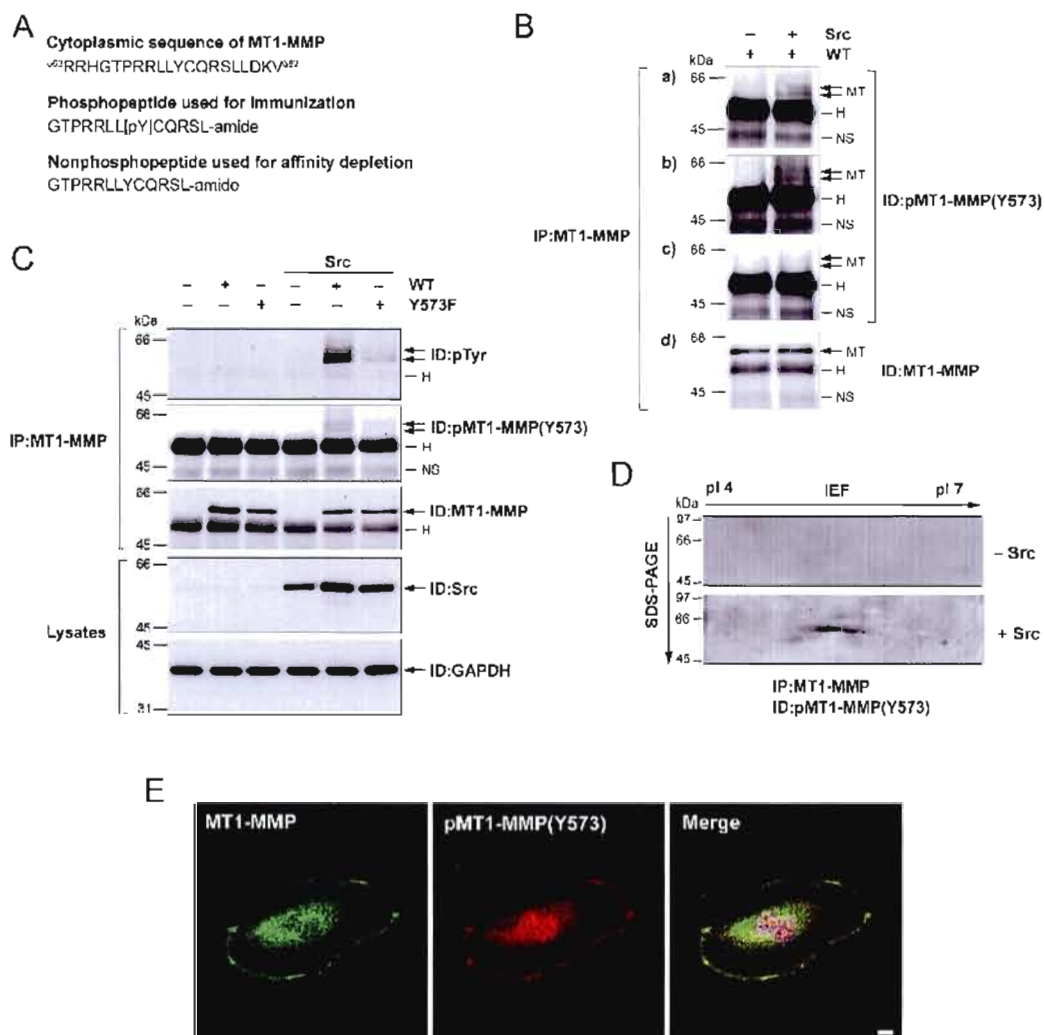


Figure 3. Generation of polyclonal phosphospecific antibodies against MT1-MMP phosphorylated on tyrosine 573.

Nyalendo *et al.*, 2007. *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p.15690-15699.

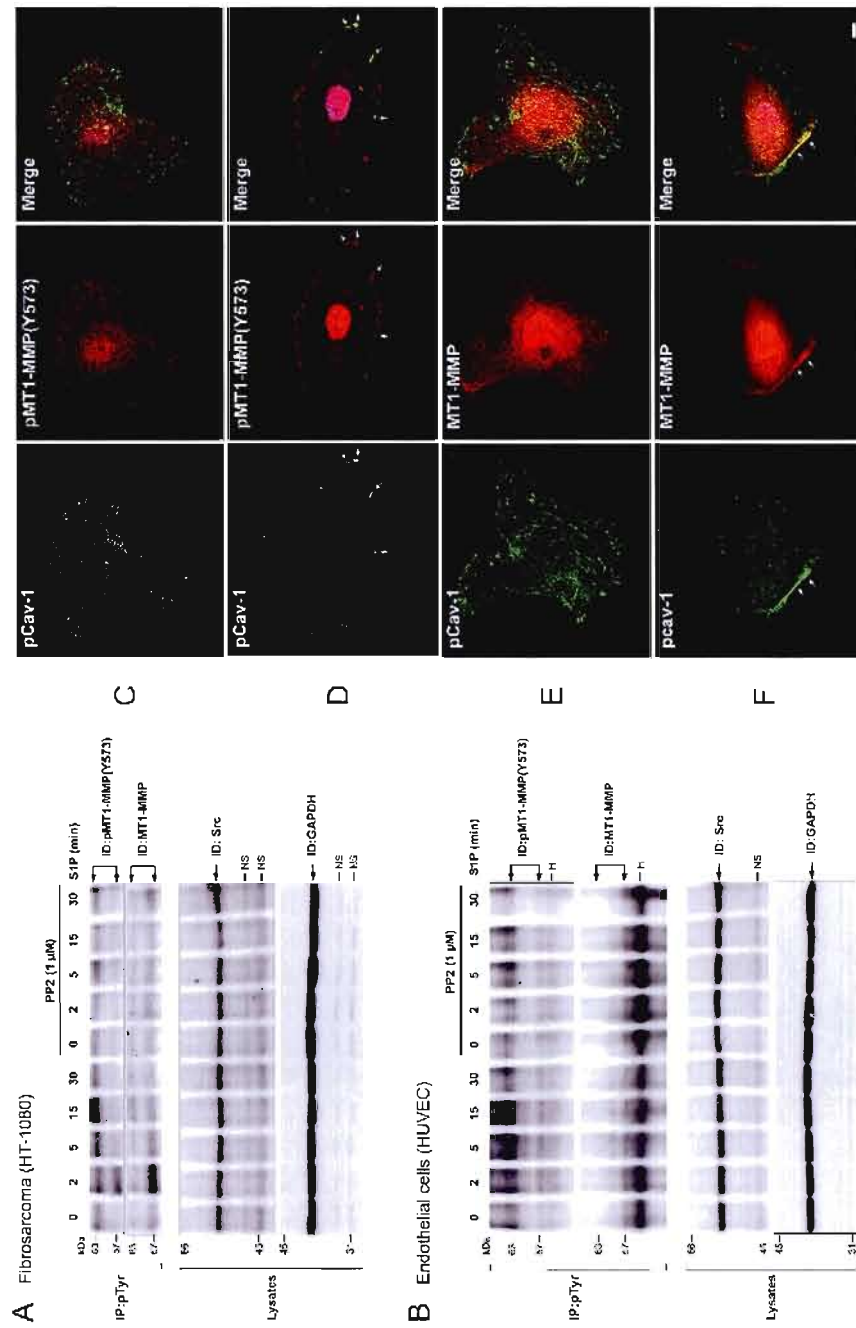


Figure 4. S1P-dependent phosphorylation of MT1-MMP in fibrosarcoma and endothelial cells. Nyalendo *et al.*, 2007. *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p.15690-15699.

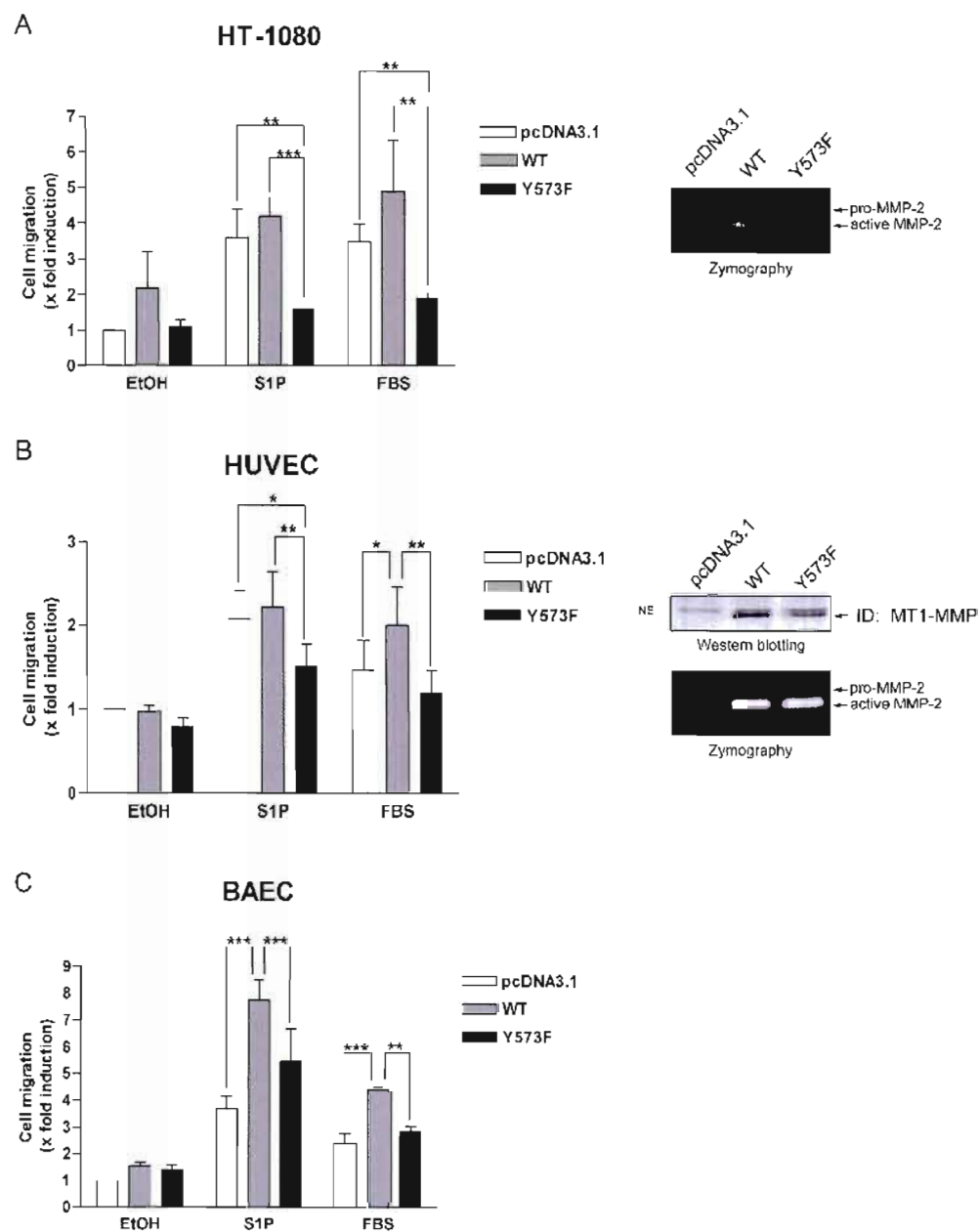


Figure 5. Mutation of cytoplasmic tyrosine 573 of MT1-MMP impairs tumor and endothelial cell migration.

Nyalendo *et al.*, 2007. *J. Biol. Chem.*, vol. 282, p.15690-15699.

4.2 L'altération de la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine réduit la prolifération des cellules tumorales dans des matrices tridimensionnelles et bloque la croissance tumorale chez la souris.

Résumé

La protéolyse péricellulaire de la matrice extracellulaire par la métalloprotéase matricielle de type membranaire 1 (MT1-MMP) confère aux cellules tumorales la capacité de proliférer dans des matrices tridimensionnelles (3D) et soutient la croissance tumorale chez la souris. Dans cette étude, nous montrons que, en plus de son activité de dégradation de la matrice extracellulaire, la phosphorylation de la MT1-MMP sur son unique résidu tyrosine situé dans sa séquence cytoplasmique (Tyr573) participe également à ces processus. Des cellules de fibrosarcome humain exprimant un mutant de la MT1-MMP, protéolytiquement actif mais non phosphorylable, montraient une réduction marquée du taux de prolifération lorsque cultivées dans des matrices de collagène 3D, cet effet antiprolifératif étant corrélé avec un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁. L'altération de la phosphorylation de la MT1-MMP sur sa tyrosine cytoplasmique inhibait également la croissance des cellules HT-1080 indépendante de l'ancrage dans l'agar mou et aussi leur invasion des barrières de collagène, deux attributs des cellules tumorales, suggérant un vaste effet inhibiteur du mutant non phosphorylable de la MT1-MMP sur la tumorigenèse. En effet, alors que les cellules HT-1080 formaient des tumeurs bien vascularisées contenant la MT1-MMP phosphorylée, la croissance tumorale était complètement abolie par l'expression du mutant non phosphorylable de la MT1-MMP. Ainsi, ces résultats indiquent qu'il existe une coopération étroite entre l'activité protéolytique de la MT1-MMP et la phosphorylation de son résidu tyrosine cytoplasmique pour la prolifération et l'invasion des cellules tumorales et suggèrent que cibler les voies de signalisation intracellulaire menant à la phosphorylation de la MT1-MMP pourrait représenter une stratégie alternative inattendue pour l'inhibition de cette enzyme.

**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION
D'UN ARTICLE DANS UNE THÈSE**

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Nous entérinons que Carine Nyalendo

est l'auteur principal de l'article intitulé :

Impaired tyrosine phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase reduces tumor cell proliferation in three-dimensional matrices and abrogates tumor growth in mice. Nyalendo C, Beaulieu E, Sartelet H, Michaud M, Fontaine N, Gingras D, Béliveau R. 2008. *Carcinogenesis*. Vol. 29, p. 1655-1664.

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse.

Co-auteur(s)

- | | | |
|--|---|--------------------------|
| 1) <u>Beaulieu, Edith</u>
Nom, prénom | 
Signature | <u>3 déc. 08</u>
Date |
| 2) <u>Sartelet, Hervé</u>
Nom, prénom | 
Signature | <u>11/12/08</u>
Date |
| 3) <u>Michaud, Marisol</u>
Nom, prénom | 
Signature | <u>4/12/08</u>
Date |
| 4) <u>Fontaine, Nicolas</u>
Nom, prénom | 
Signature | <u>11/12/08</u>
Date |
| 5) <u>Gingras, Denis</u>
Nom, prénom | 
Signature | <u>11/12/08</u>
Date |
| 6) <u>Béliveau, Richard</u>
Nom, prénom | 
Signature | <u>12/12/08</u>
Date |

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

J'ai personnellement effectué la recherche bibliographique, la planification expérimentale, la réalisation des expériences et la rédaction du manuscrit. Marisol Michaud, une étudiante à la maîtrise, a participé à la réalisation des transfections stables. La Dre Edith Beaulieu a participé à la réalisation des transfections stables et à la mise au point de la culture de cellules en trois dimensions. Le Dr Hervé Sartelet, pathologiste au CHU Sainte-Justine, a effectué les coupes histologiques présentées à la figure 5. Nicolas Fontaine, un stagiaire de baccalauréat, a effectué les dosages d'hydroxyproline présentés à la figure 2D.

Le Dr Denis Gingras est le superviseur du projet et a étroitement contribué à son élaboration et à la révision du manuscrit.

Le Dr Richard Béliveau est mon directeur de thèse. Il m'a guidé aux niveaux conceptuel et technique dans la réalisation du projet.

ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

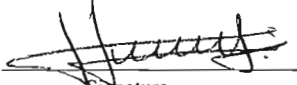
Impaired tyrosine phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase reduces tumor cell proliferation in three-dimensional matrices and abrogates tumor growth in mice.

soumis pour publication ☐, accepté pour publication ☐, ou publié ☒ dans : Carcinogenesis,

est : **Carine Nyalendo**

Auteur principal


Nyalendo, Carine
Nom, Prénom


Signature

12/12/08
Date

Directeur de recherche

Béliveau, Richard
Nom, Prénom


Signature

12/12/08
Date

Manuscrit

4.2 Impaired tyrosine phosphorylation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase reduces tumor cell proliferation in three-dimensional matrices and abrogates tumor growth in mice[¶]

Carine Nyalendo^{1,3}, Edith Beaulieu¹, Hervé Sartelet², Marisol Michaud^{1,3}, Nicolas Fontaine¹,
Denis Gingras¹, Richard Béliveau^{1,3*}

¹Laboratoire de Médecine Moléculaire, Centre de Cancérologie Charles-Bruneau, CHU Sainte-Justine. ²Département de Pathologie, CHU Sainte-Justine. ³Centre de Recherches Biomédicales de l'Université du Québec à Montréal

*To whom correspondence should be addressed : Laboratoire de médecine moléculaire Ste-Justine-UQAM, Centre de cancérologie Charles-Bruneau, 3175, Chemin Côte-Ste-Catherine, Montréal, Québec (Canada)
H3T 1C5 Phone: (514) 345-2366
FAX: (514) 345-2359
E-mail: molmed@recherche-ste-justine.qc.ca

[¶] Supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research to R.B. and D.G.

Running Title: Involvement of phosphorylated MT1-MMP in tumor growth

Abstract

Pericellular proteolysis of the extracellular matrix by membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) confers tumor cells with the ability to proliferate within three-dimensional (3D) matrices and sustains tumor growth in mice. In this study, we show that in addition to its matrix-degrading activity, phosphorylation of MT1-MMP on its unique tyrosine residue located within its cytoplasmic sequence (Tyr573) may also participate to these processes. Fibrosarcoma cells expressing a proteolytically active but non phosphorylable mutant of MT1-MMP showed a markedly reduced proliferation rate when embedded within 3D type I collagen matrices, this antiproliferative effect being correlated with arrest in the G₀/G₁ phase of the cell cycle. Impaired tyrosine phosphorylation of MT1-MMP also inhibits anchorage-independent growth of HT-1080 cells in soft agar as well as their invasion of collagen barriers, two prominent attributes of tumor cells, suggesting a broad inhibitory effect of the MT1-MMP mutant on tumorigenesis. Accordingly, whereas HT-1080 cells formed well vascularized tumors containing tyrosine phosphorylated MT1-MMP, tumor growth was completely abolished by expression of the non phosphorylable MT1-MMP mutant. These findings thus indicate a close cooperation between the matrix-degrading activity of MT1-MMP and tyrosine phosphorylation of its intracellular domain for tumor cell invasion and proliferation and suggest that the targeting of the intracellular signaling pathways leading to tyrosine phosphorylation of MT1-MMP may represent an unexpected alternative strategy for the inhibition of this enzyme.

Introduction

The degradation of extracellular matrix (ECM) proteins by members of the matrix metalloproteinases (MMPs) plays a crucial role in several processes underlying tumor progression, including cell attachment, cell migration, invasiveness, cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis (Edwards et Murphy, 1998 ; Egeblad et Werb, 2002 ; Folgueras *et al.*, 2004 ; van Hinsbergh, Engelse et Quax, 2006). Recent studies have provided convincing evidence that membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP), a membrane-anchored MMP, plays essential roles in tumor cell migration and invasion by acting as a potent matrix-degrading protease that proteolyzes a broad spectrum of ECM proteins (d'Ortho *et al.*, 1997 ; Hiraoka *et al.*, 1998 ; Pei et Weiss, 1996) as well as a number of cell surface-associated adhesion receptors (Belkin *et al.*, 2001 ; Kajita *et al.*, 2001). MT1-MMP is overexpressed in many types of tumors (Nakada *et al.*, 1999 ; Zhai *et al.*, 2005) and pericellular proteolysis of the dense cross-linked meshwork of type I collagen fibrils mediated by the enzyme confers neoplastic cells with tissue-invasive activity (Sabeh *et al.*, 2004) and sustains tumor cell growth in otherwise growth-restrictive three-dimensional (3D) matrices (Hotary *et al.*, 2003).

In addition to its important matrix-degrading activity, MT1-MMP contains a short cytoplasmic sequence whose function remains largely unknown but seems important. Cells expressing cytoplasmic domain-deleted MT1-MMP mutants retain the ability to proteolyse the ECM but have a markedly reduced migratory potential (Gingras *et al.*, 2001 ; Labrecque *et al.*, 2004 ; Langlois, Gingras et Beliveau, 2004 ; Lehti *et al.*, 2000 ; Uekita *et al.*, 2001), suggesting a role of this domain in linking extracellular proteolysis to intracellular signaling events involved in cell locomotion. Actually, the cytoplasmic sequence of MT-MMP actively participates to the internalization of the enzyme (Uekita *et al.*, 2001), to the activation of the ERK signaling pathway (D'Alessio *et al.*, 2008 ; Gingras *et al.*, 2001) as well as to its interaction with tyrosine phosphorylated caveolin-1 (Labrecque *et al.*, 2004), and these events may all contribute to efficient cell locomotion triggered by the enzyme. More recently, we reported that MT1-MMP is phosphorylated on its unique cytoplasmic tyrosine residue and that this event may also participate to cell migration (Nyalendo *et al.*, 2007), possibly by

inducing a relocalization of the enzyme at the leading edge of migrating cells (Gingras *et al.*, 2008).

Although the mechanisms leading to the Src family kinase-dependent tyrosine phosphorylation of MT1-MMP remain to be unveiled, we observed that expression of a dominant-negative, non phosphorylable MT1-MMP mutant inhibits phosphorylation of the enzyme and interfere with the migration of both tumor and endothelial cells (Nyalendo *et al.*, 2007). We report herein that impaired tyrosine phosphorylation of MT1-MMP also markedly reduces the tumorigenic properties of the highly invasive HT-1080 fibrosarcoma cell line by interfering with the proliferation of these cells within type I collagen three-dimensional matrices, leading to a complete inhibition of tumor growth in nude mice.

Materials and methods

Generation of cell lines

The cDNAs encoding the full-length human MT1-MMP and its cytoplasmic domain mutant (Y573F) have been described (Nyalendo *et al.*, 2007). Human fibrosarcoma cells HT-1080 (grown in minimum essential medium (MEM) supplemented with 1 mM sodium pyruvate, 10% FBS and 4 mM glutamine) were transfected using the FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canada) according to the manufacturer's instructions. Stably transfected cells were selected and maintained in 250 µg/mL Zeocin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Control cells were stably transfected with the empty vector (pcDNA3.1) and were selected and maintained in 200 µg/mL G418. Stable clones expressing high levels of MT1-MMP mRNA and which exhibit high activity of MMP-2 activation (compared to control cells) were used. The selected stable clones were assessed for two- and three- dimensional cell proliferation, flow cytometry and zymography assays. Data presented in this manuscript represent the results obtained from at least three independent clones.

2D/3D culture and cell invasion

Type I collagen was extract from rat tail and resuspended at 2.7 mg/mL in acetic acid. For 2D culture, stable clones were seeded on dishes plates coated with 100 µg/mL type I collagen. For 3D culture, stable clones were mixed with 10X MEM, 0.17N NaOH and 2.7 mg/mL type I collagen. The mixture was allowed to gel for 45 min at 37°C and culture media containing 10% FBS was added atop. For growth inhibition, 50 ng/mL of TIMP-1/2 (Chemicon International, Temecula, CA, USA) and 50 µM GM6001 (Calbiochem, San Diego, CA, USA) were incorporated into both the collagen gel and the culture medium. Collagen gels were dissolved with 2 mg/mL bacterial collagenase (Sigma, Burlington, ON, Canada) and viable cells were counted by trypan blue exclusion using a hemacytometer. For

cell invasion assays, type I collagen (0.5 mg/mL) was allowed to gel in the upper well of 24-mm Transwells (Corning, Lowell, MA, USA). After gelling, 5×10^5 cells in medium without serum were added atop of the collagen gel, and medium with serum (10% FBS) was added to the lower chamber. After 48 h, cells that had invaded the gel were quantified using computer-assisted imaging Northern Eclipse 6.0. The data are expressed as the average density of migrated cells/4 fields. For cell invasion in dense collagen gels (2.2 mg/mL), the same procedure was applied except that cells were allowed to invade the matrix during 8 days. Collagen gels were then fixed with 10% formalin phosphate, paraffin-embedded and stained with hematoxylin, phloxin and saffron (HPS).

RNA isolation and real-time quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR)

Stable clones were cultured within type I collagen matrix (2.2 mg/mL) for 5 days. Cells were extracted with collagenase and total RNA was isolated using QIAzol Lysis Reagent (Qiagen, Mississauga, ON, Canada), according to the manufacturer's instructions. Equal amounts (2 µg) of purified RNA were used to synthesize first strand cDNA with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). qPCR for gene quantification was performed from first strand cDNA using the iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) and the following primers designed for the human MT1-MMP gene: forward, 5'-GAGGGCTGCCTACCGACAAGAT-3'; reverse, 5'-CCTTCCCAGACTTTGATGTTCTTGG-3'. β-actin (primers from Qiagen) was used as internal control. DNA amplification was achieved on the iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) in the following conditions: 1 cycle (10 min at 95°C,) then 40 cycles (10 sec at 95°C; 30 sec at 60°C and 30 sec at 72°C) and finally 41 cycles of increasing the temperature 1°C every 10 sec starting at 55°C.

Immunofluorescence and Confocal Microscopy

Stable clones were cultured within type I collagen matrix (2.2 mg/mL) during 5 days. Collagen gels were then fixed with 10% formalin phosphate, paraffin-embedded, cut in 3 μ m-thick sections and mounted into pretreated slides (Superfrost +). Paraffin was removed using toluene and the samples were rehydrated with ethanol. For antigen retrieval, the samples were incubated in citrate buffer for 10 min at 95°C and cooled in the same buffer at room temperature for 20 min. After 10 min of incubation with 20 μ M Hoechst for nuclei staining, samples were permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min and blocked (1% BSA in Tris Buffer Saline containing 0.1% Tween 20) for 30 min. Samples were then incubated with tetramethylrhodamine B isothiocyanate-conjugated phalloidin (for actin staining) for 30 min, and stained with specific primary antibodies against phophoMT1-MMP (Nyalendo *et al.*, 2007) or MT1-MMP (MAB3328, Chemicon International) for 30 min, followed by 30 min-incubation with Alexa488-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes – Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Samples were covered with Immuno-Fluore Mounting Medium (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Immunostaining was visualized and photographed using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

Anchorage-independent growth assay

Six-well plates were covered with 1.5 mL of 0.5% agar (Sigma, Oakville, ON, Canada) in complete medium (MEM, 1 mM pyruvate, 10% FBS). 2×10^4 cells were suspended in 6 mL of 0.35% agar in complete medium, and 1.5 mL of this mixture (5×10^3 cells) were added atop the 0.5% agar. Cells were allowed to form colonies for 15 days, at 37°C. Colonies were stained overnight with 0.005% crystal violet. Microscopic colonies were visualized and counted using light microscope (objective 4X) while macroscopic colonies were visible to the naked eye.

Flow Cytometry Analysis of MT1-MMP

Cells were harvested with 0.5 mM EDTA/PBS and washed twice with binding buffer (BB) containing 0.1% BSA in PBS. In experiments using cells grown in 3D collagen matrices, cells were first extracted from the gels using bacterial collagenase and then processed for analysis. 10^6 cells were incubated for 1 h at 4°C with 1 mL of 1 µg/mL MT1-MMP (MAB3328) antibody or a control mouse IgG (Sigma, Oakville, ON, Canada) in BB, washed twice with BB and incubated with anti-mouse FITC-conjugated antibody for 30 min at 4°C in the dark. After two washes, cells were resuspended in 1 mL BB and analyzed using the FACS Calibur (BD Biosciences).

Annexin V/PI staining

Cells were harvested with 0.5 mM EDTA/PBS, washed twice with PBS, double-stained with FITC-Annexin V and propidium iodine using the ApoAlert® Annexin V Apoptosis Kit (BD Biosciences- Clontech, Oakville, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions, analyzed using the FACS Calibur. Double-staining of cells with FITC-Annexin V and PI permits the discrimination of living cells (FITC-PI-), early apoptotic (FITC+PI-), late apoptotic (FITC+PI+) or necrotic cells (FITC-PI+).

Aneuploidy and Cell Cycle Analysis

Cells were trypsinized, washed twice with PBS containing 5mM EDTA and fixed (10^6 cells) in 75% ethanol overnight at -20°C. In experiments using cells grown in 3D collagen matrices, cells were first extracted from the gels using bacterial collagenase prior to fixation in ethanol. Cells were then washed twice and stained with 50 µg/mL propidium iodide containing 20 µg/mL RNase A for 1 h at 37°C in the dark. Cell cycle and DNA content were then analyzed using FACS Calibur (BD Biosciences).

Immunoprecipitation and Western Blotting

The procedures have been described previously (Labrecque *et al.*, 2004). Briefly, equal amounts of proteins were incubated overnight at 4°C in the presence of 1 µg/ml of MT1-MMP monoclonal antibody and the immune complexes were collected by incubating the mixtures with protein G-coupled Sepharose beads. Bound material was solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 5 min, separated by SDS-PAGE and immunoblotted.

Zymography

20 µL of conditioned media were resuspended in non-reducing sample buffer and subjected to SDS-PAGE, using polyacrylamide gels containing 1 mg/mL gelatin. Gels were then washed twice for 30 min in 2.5% Triton X-100 and rinsed with nanopure water. Gels were incubated at 37°C in zymography buffer (50 mM Tris pH 7.6, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij 35) for 18 h and digested areas were visualized by coloration of the gels with Coomassie Blue.

Measurement of collagenolytic activity

Collagenolytic activity of HT-1080 transfectants grown in 3D collagen gels was determined by the measure of hydroxyproline released in the culture media, as described (Creemers *et al.*, 1997).

In vivo tumor growth

6 week-old female immunodeficient nude mice (CrI: CD-1[®] -Foxn^{nu}) were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council of Animal Care. 5×10^6 viable cells (stably transfected clones) were resuspended in 100 μ L of 1% methylcellulose in serum-free MEM. Mice were anesthetized with O₂/isoflurane inhalation and cells were implanted subcutaneously into the flank of mice. The tumor size was measured every 3 days using a digital caliper. Tumor size was calculated as follow: $\pi/6 \times \text{length} \times \text{width}^2$. Animals were sacrificed after 34 days.

Histological Analysis and Immunohistochemistry

Tumor xenografts were fixed in 10% formalin phosphate and embedded in paraffin. For routine histological examination, 3 μ m-thick sections were stained with hematoxylin, phloxin and saffron (HPS). Immunohistochemistry was performed on paraffin-embedded sections using the biotin-streptavidin peroxidase LSAB kit in conjunction with an automated DAKO immunostainer (DakoCytomation, CA, USA). First, for antigen retrieval, deparaffinized and rehydrated sections were incubated in citrate buffer for 30 min. The sections were then mounted in the DAKO autostainer, covered with H₂O₂ for 5 min, followed by a 5 min application of Ultra V block (LabVision). The slides were then incubated at room temperature with anti-CD31 (PECAM-1, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-MT1-MMP AB815 (Chemicon International) and anti-phosphoMT1-MMP or non-specific mouse or rabbit IgG as negative controls, followed by the addition of the labelled biotin-streptavidin reagents, according to the manufacturer's instructions (LSAB+System HRP-Kit; DAKO). DAB (DAKO) was used as a chromogen.

Statistical analysis

All statistical analysis were performed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-tests. Analyses were performed using GraphPad Prism program. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

A non phosphorylable MT1-MMP mutant reduces tumor cell proliferation within 3D matrices.

We generated stable clones of human fibrosarcoma cells (HT-1080) expressing either the wild type form of MT1-MMP (MT1 WT) or a non phosphorylable version of the enzyme (MT1 Y573F) (Figure 1A). Using antibodies specifically recognizing the tyrosine phosphorylated form of MT1-MMP (Nyalendo *et al.*, 2007), we observed that overexpression of the wild type form of MT1-MMP was correlated with increased phosphorylation of the enzyme, particularly when cells were grown within (3D) type I collagen gels (Fig. 1A). By contrast, the tyrosine phosphorylation of MT1-MMP was reduced in cells expressing the non phosphorylable version of the enzyme, indicating that the mutant acts in a dominant-negative manner in these cells (Fig. 1A, (Nyalendo *et al.*, 2007)). Due to elevated turnover of the enzyme (Lehti *et al.*, 2002 ; Lehti *et al.*, 1998), MT1-MMP was expressed at relatively low levels at the surface of both control and stably transfected cells grown atop (2D) collagen (Fig. 1B); however this cell surface localization was significantly increased in cells overexpressing the wild type as well as the non phosphorylable forms of MT1-MMP in cells grown within (3D) type I collagen gels (Fig. 1B). Moreover, although MT1-MMP mRNA levels were similar in cells overexpressing either the wild type or the non-phosphorylable forms of the enzyme (Fig. 1C), MT1-MMP was expressed in a higher extent in cells expressing the non phosphorylable form (Y573F) of the enzyme (Fig. 1A-B), possibly due to reduced internalization caused by the lack of LLY⁵⁷³ cytoplasmic motif (Uekita *et al.*, 2001). Interestingly, confocal images of HT-1080 cells embedded in collagen gels showed that overexpression of wild type MT1-MMP increased tyrosine phosphorylation of the enzyme and spreading of the cells within the collagen gel, whereas cells expressing the non-phosphorylable MT1-MMP mutant had markedly reduced levels of phosphorylated MT1-MMP and showed a compact, spherical configuration (Fig. 1D).

We next examined the impact of tyrosine phosphorylation on MT1-MMP-mediated tumor cell proliferation. Cells expressing either the empty vector (pcDNA), the wild type form of MT1-MMP or the non phosphorylable version of the enzyme showed similar proliferation rates on 2D collagen, with an exponential growth phase occurring between day 3 and 5 (Fig. 2A). By contrast, when cells were embedded within a 3D collagen matrix, basal (pcDNA) tumor cell proliferation was significantly reduced, as previously reported (Hotary *et al.*, 2003), but could be significantly increased by overexpression of wild type MT1-MMP (2.4-fold compared to control cells at day 7). Interestingly, however, although all transfected cells were viable (Fig. 2B), those expressing the non phosphorylable form of MT1-MMP showed markedly reduced proliferative rates in the 3D collagen gel, with 50 % and 80% inhibition of cell proliferation compared to pcDNA- and wild type MT1-MMP-transfected cells, respectively (Fig. 2A). Similar results were observed when cells were grown within a 3D fibrin matrix (unpublished observations, C. Nyalendo). The inhibitory effect on cell proliferation by the non phosphorylable form of MT1-MMP suggests that impaired tyrosine phosphorylation of MT1-MMP reduces tumor cell proliferation in 3D collagen gels triggered by this enzyme.

We next examined if the inhibition of tumor cell proliferation of cells expressing the non phosphorylable MT1-MMP mutant was related to alterations in the proteolytic activity of the enzyme. As expected, the growth of tumor cells within 3D collagen matrix (but not on 2D) was abolished by TIMP-2 (but not TIMP-1) as well as by the synthetic MMP inhibitor GM6001, illustrating the crucial role of collagenolysis in this process (Fig. 2C; (Hotary *et al.*, 2003)). However, we observed that cells expressing either the wild type MT1-MMP or the Y573F mutant both activate proMMP-2 to its active form and had similar collagenolytic activities, as reflected by the quantitation of hydroxyproline released from the collagen matrices (Fig. 2D). In fact, since HT-1080 cells expressing the MT1-MMP mutant have a much lower proliferation rate in 3D collagen matrices (see Fig. 2A), the amount of hydroxyproline released per cell was 8-fold higher for these cells than for those expressing wild type MT1-MMP (Fig. 2D), further emphasizing that the inhibitory effect of the MT1-MMP mutant on tumor cell proliferation is not related to defective proteolysis.

These results thus indicate that MT1-MMP-mediated proteolysis is necessary to confer tumor cells with a proliferative advantage within a 3D collagen matrix but also raises the intriguing possibility that the catalytic activity of the enzyme may not be sufficient for this process.

Impaired tyrosine phosphorylation of MT1-MMP induces cell cycle alterations in tumor cells embedded within 3D collagen gels.

It was previously reported that MT1-MMP-dependent cell proliferation within 3D collagen gels correlated with increased cyclin D₃ kinase activity (Hotary *et al.*, 2003), suggesting a functional coupling between proteolysis of the surrounding collagen matrix and cell cycle progression. As shown in Fig. 3A, when grown under planar conditions, cell cycle progression of the HT-1080 transfectants was similar, with almost half of the cells in quiescence (G₀/G₁), and the other half in growth phases (S and G₂/M). Although cells overexpressing the non phosphorylable mutant showed proliferation rates similar to those expressing the wild type version of MT1-MMP (Fig. 2A), a small but significant increase of cells in G₀/G₁ as well as a decrease in G₂/M phases were routinely observed. These effects were however more pronounced in cells grown within 3D collagen gels, with most of the cells expressing wild type MT1-MMP in growth phases (S and G₂/M), while expression of the MT1-MMP Y573F mutant markedly increased the proportion of quiescent cells (10% more cells in G₀/G₁), concomitant with a significant diminution of proliferative cells (G₂/M) (Fig. 3A). Such an induction of cell growth arrest in 3D by non-phosphorylable MT1-MMP was correlated with diminution of cyclin D₃ and cyclin-dependant kinase 4 (CDK4) levels (no significant changes were observable for cyclin D₁). Furthermore, the non phosphorylable form of MT1-MMP induced a dramatic increase of the CDK4/6 inhibitor p16^{INK4A} (while p15^{INK4B} levels were not modulated), being observable only when cells were grown in 3D collagen matrix (Fig. 3B).

Analysis of DNA content by flow cytometry also indicated that overexpression of MT1-MMP leads to aneuploidy, as recently reported (Golubkov *et al.*, 2006), with 9.9% of the wild type MT1-MMP-expressing cells showing an aberrant DNA content (up to 8n), compared to only 5.8% for control cells (Fig. 3C). In addition to its inhibitory effect on cell cycle progression, impairment of tyrosine phosphorylation of MT1-MMP completely reversed this MT1-MMP-induced polyploidy in fibrosarcoma cells, with only 5.1% of the non phosphorylable MT1-MMP-expressing cells showing aberrant DNA content (Fig. 3C). These results thus suggest that the reduction of cell proliferation induced by the non phosphorylable MT1-MMP mutant may be related to an inhibitory effect of the mutant on cell cycle progression.

Tyrosine phosphorylation of MT1-MMP is important for invasion of collagen barriers by tumor cells.

We next investigated the involvement of tyrosine phosphorylation of MT1-MMP on tumor cell invasion of collagen barriers. When seeded atop type I collagen gel, the endogenous MT1-MMP levels of HT-1080 cells confers these cells with the ability to invade the collagen gels to a significant extent; however, overexpression of wild type MT1-MMP promoted a marked increase in these invasive properties and, as expected, this invasion program required the catalytic activity of the enzyme, as reflected by its sensitivity to TIMP-2 and GM6001 (Fig. 4A). By contrast, the invasive potential of cells expressing the non phosphorylable MT1-MMP mutant was dramatically decreased, being 8-fold lower than cells expressing its wild type counterpart and 3-fold lower than control HT-1080 cells. Similar results were also observed when cells were allowed to invade a more dense (2.2 mg/mL) collagen gel; histological analysis of cross-sections from these gels showed that invasion of the gel was significantly increased by expression of wild type MT1-MMP whereas cells expressing the non phosphorylable MT1-MMP mutant mostly remained at the surface (red arrows, Fig. 4B).

Tyrosine phosphorylation of MT1-MMP is important for anchorage-independent growth of tumor cells.

We next monitored the effect of the non phosphorylable MT1-MMP on the anchorage-independent growth of HT-1080 cells. As shown in Figure 5, control HT-1080 cells formed a significant number of colonies in soft agar but overexpression of wild type MT1-MMP had no effect on the total number of colonies, as reported (Li *et al.*, 2004), although it significantly increased the size and the number of large (macroscopic) colonies. Interestingly, expression of the non phosphorylable MT1-MMP mutant antagonized these anchorage-independent growth properties of fibrosarcoma cells, with a 3-fold reduction in the number of colonies formed in soft agar. Since the growth of HT-1080 cells in soft agar does not require the proteolytic activity of MT1-MMP (Li *et al.*, 2004), these results provide additional support for an important role of the phosphorylated form of the enzyme in cell proliferation, independent of the intrinsic catalytic activity of the enzyme.

Tyrosine phosphorylation-defective MT1-MMP abrogates the growth of human fibrosarcoma xenografts.

To examine the impact of impaired tyrosine phosphorylation of MT1-MMP on tumor growth *in vivo*, stably transfected HT-1080 clones expressing wild type MT1-MMP, the non phosphorylable version of the enzyme or the empty vector were implanted in mice and tumor size was monitored 34 days post-implantation. As shown in Figure 6A, both pcDNA (5/8) and wild type MT1-MMP-expressing (7/7) fibrosarcoma cells induced the formation of tumors in nude mice, overexpression of MT1-MMP inducing a significant increase in the mean tumor size. Interestingly, fibrosarcoma cells expressing the non phosphorylable version of MT1-MMP failed to grow and form tumors (1/6 for clone a; 0/6 for clone b), even 3 months post-implantation (unpublished observations, C. Nyalendo).

Histological analysis of xenografts formed by the wild type MT1-MMP-expressing cells revealed a poorly differentiated malignant tumor formed by a majority of spindle cells associated with round cells. The presence of nuclear atypical (black arrows) as well as mitotic figures (yellow arrows) indicates highly active cellular proliferation, characteristic of tumor cells (Fig. 6B, HPS) while CD31 immunostaining of endothelial cells shows an elevated number of tumor-associated blood vessels (Fig. 6B). MT1-MMP was expressed by the majority of the tumor cells but, interestingly, the distribution of the phosphorylated form of the enzyme appears to be much more restricted, being predominantly detected in cells located at the proximity of blood vessels (Fig. 6B).

Although the absence of tumor growth in animals implanted with cells expressing the non phosphorylable MT1-MMP mutant precludes a detailed analysis of these tumor cells *in vivo*, preliminary experiments revealed that fibrosarcoma cells expressing either the wild type or the mutated version of MT-MMP induced the development of small lesions (microtumors) with similar volumes (about 40 mm³) 6 days after subcutaneous implantation. Low magnification histological examination of paraffin sections from these early microtumors showed that these two types of xenografts formed a well delimited lesion (Fig. 6C, HPS, upper panels) and seemed similar at first glance. However, at high magnification, the lesions appeared highly different: the microtumor formed by the wild type MT1-MMP-expressing cells was mainly formed by tumor cells (Fig. 6C, HPS, lower panel), and already contained blood vessels (Fig. 6C, CD31 immunostaining); by contrast, the lesions induced by cells expressing the non-phosphorylable version of MT1-MMP lacked either tumor cells (Fig. 6C, HPS, lower panel) or blood vessels (Fig. 6C, CD31 immunostaining) and were predominantly composed of mouse immune cells and swollen histiocytes. As expected, MT1-MMP was highly expressed in the microtumor derived from wild type MT1-MMP-expressing cells, whereas it was absent in that induced by cells expressing the mutant (Fig. 6C). Overall these results indicate that tumor cells expressing the non phosphorylable form of MT1-MMP have lost the ability to grow *in vivo*, being rapidly eliminated by the innate immune cells of the animal, further suggesting an important function of tyrosine phosphorylated MT1-MMP in the tumorigenicity of fibrosarcoma cells.

Discussion

Our results confirm previous findings showing that MT1-MMP is indeed a major collagenolytic enzyme that enables tumor cells to cleave 3D barriers of fibrillar collagen and make it permissive for proliferation and migration (Hotary *et al.*, 2000 ; Hotary *et al.*, 2003 ; Sabeih *et al.*, 2004). Importantly, however, we observed that tumor cells expressing a MT1-MMP point mutant lacking a single tyrosine phosphorylation site within its intracellular domain (Y573), showed markedly impaired invasion and proliferation activities within these 3D type I collagen gels, in spite of similar expression of the enzyme at the cell surface as well as unaltered proteolytic activities towards proMMP-2 and fibrillar collagen. These observations thus raise the interesting possibility that the proteolytic activity of MT1-MMP, although essential for the degradation of collagen barriers, may not be sufficient *per se* to sustain the proliferation of tumor cells within a 3D environment and suggest that signals originating from the intracellular domain of the enzyme also participate to this process.

While the importance of the cytoplasmic sequence of MT1-MMP for cell migration and invasion has been repeatedly suggested in recent years (Itoh et Seiki, 2006), the molecular events underlying this requirement still remain largely unknown. Src family kinase-dependent phosphorylation of the unique tyrosine residue located within this sequence was recently suggested as an attractive means by which this regulatory function may be achieved, based on the relocalization of the tyrosine phosphorylated form of MT1-MMP at the leading edge of migrating cells (Gingras *et al.*, 2007 ; Nyalendo *et al.*, 2007) as well as by the potent inhibitory effect of a dominant-negative, non phosphorylable MT1-MMP mutant on cell locomotion (Nyalendo *et al.*, 2007). Results from the current work support such an important role of tyrosine phosphorylated MT1-MMP by showing that decreased tyrosine phosphorylation of the endogenous enzyme mediated by expression of a non phosphorylable MT1-MMP mutant was correlated with a marked reduction of the invasiveness and proliferation of fibrosarcoma cells embedded in a type I fibrillar collagen network. This inhibitory effect was independent of the enzyme's proteolytic activity but correlated with major alterations in the cell cycle of cells growing in the 3D environment. We observed that

the wild type version of MT1-MMP increases the activity of the cell cycle machinery, leading to enhanced proliferation and to an increase in the aberrant DNA content of HT-1080 cells. However, the expression of the non phosphorylable MT1-MMP mutant down-regulated cyclin D₃ and CDK4 levels, and increased considerably the levels of the cytostatic mediator p16^{INK4A}, resulting in cell cycle arrest in G₀/G₁ and to the reversal of polyploidy. This suggests that impaired tyrosine phosphorylation of MT1-MMP may counteract the cell cycle changes normally induced by the enzyme, such as increased cyclin D₃ kinase activity (Hotary *et al.*, 2003).

Although the upstream mechanisms responsible for the inhibitory effect of the non phosphorylable MT1-MMP mutant on tumor cell proliferation remain to be more investigated, it is tempting to speculate that the formation of molecular complexes containing tyrosine phosphorylated MT1-MMP and key signaling intermediates, such as tyrosine phosphorylated caveolin-1 (Nyalendo *et al.*, 2007) or p130Cas (Gingras *et al.*, 2007), may participate to the regulation of key cell cycle checkpoints and confer a growth advantage to tumor cells embedded within 3D collagen gels. In this respect, it is noteworthy that at least one of the currently identified proteins that interact with tyrosine phosphorylated MT1-MMP, p130Cas, acts as a positive regulator of both proliferation and survival in normal and transformed mammary epithelial cells by activating signaling pathways leading to cell cycle progression (Cabodi *et al.*, 2006). Such an interference of the MT1-MMP mutant with signaling pathways leading to cell cycle progression would also explain the inhibitory effect of the mutant on anchorage-independent growth of HT-1080 cells in soft agar, a prominent feature of tumorigenic cells that is independent of proteolysis (Li *et al.*, 2004) but rather reflects major alterations in cell cycle machinery and in the organization of the cell's cytoskeleton (Pawlak et Helfman, 2001). In addition, since aneuploidy is the outcome of deregulation of the cell cycle progression through alteration of the mitotic checkpoint (Kops, Weaver et Cleveland, 2005) and that MT1-MMP has been shown to confer aneuploidy and tumorigenicity to nonmalignant epithelial cells by the MT1-MMP-mediated proteolytic degradation of pericentrin (Golubkov *et al.*, 2006), it is possible that the reversal of polyploidy mediated by the MT1-MMP mutant observed in the current study may be related to an inhibitory effect on these processes. Although these mechanisms remain to be identified

at the molecular level, these results nevertheless suggest that tyrosine phosphorylation of the intracellular domain of MT1-MMP may play an instrumental role in the tumorigenic properties of cancer cells.

In this respect, we observed that an important consequence of the inhibitory effect of the phosphorylation defective MT1-MMP mutant on tumor cell proliferation and invasion is its ability to prevent tumor growth in nude mice. HT-1080 formed well defined tumors containing numerous blood vessels and rapidly proliferating cells, as reported previously (Nonaka *et al.*, 2005). Although all tumor cells express MT1-MMP, we observed that the tyrosine phosphorylated form of the enzyme was restricted to a subset of tumor cells located at the vicinity of tumor-associated vessels. Since tumor cells at proximity of these blood vessels are exposed to higher oxygen concentrations and divide more rapidly (Hoogsteen *et al.*, 2005 ; Pavelic, Allen et Mihich, 1981), the preferential tyrosine phosphorylation of MT1-MMP in these proliferating cells support a potential important role of the phosphorylated protein in tumor cell proliferation and strengthen the hypothesis that the dominant-negative effect of the MT1-MMP mutant against tyrosine phosphorylation of endogenous MT1-MMP observed *in vitro* is responsible for the antitumor activity of the mutant *in vivo*.

Our results stand in contrast to previous studies showing that in otherwise invasion-incompetent cells, overexpression of a MT1-MMP mutant lacking the entire cytoplasmic sequence confers these cells with the ability to proliferate within collagen gels and to invade ECM barriers similar to that induced by the wild type enzyme (Hotary *et al.*, 2000 ; Hotary *et al.*, 2006 ; Hotary *et al.*, 2003). Although this discrepancy remains to be solved, we posit that the dominant-negative MT1-MMP mutant impairs tyrosine phosphorylation of the endogenous MT1-MMP pool, inducing competition for the activation of the cell autonomous invasion program. This competition would lead to reduced cell cycle progression and proliferation, notwithstanding adequate proteolysis of the surrounding 3D matrix. By contrast, in cells expressing the cytoplasmic domain-deleted mutant, pericellular proteolysis induced by the enzyme releases the growth constraints induced by the 3D environment, without any interference with the intrinsic cell invasion program, and would thus be

sufficient to confer cells with in a 3D growth advantage and to sustain tumor progression (Hotary *et al.*, 2003). However, an essential role of the intracellular domain of MT1-MMP for the growth of poorly invasive MCF-7 cells *in vivo* was recently reported (D'Alessio *et al.*, 2008), suggesting that a requirement for this domain may also depend on the intrinsic invasion program of the recipient cells.

During tumor progression, cancer cells must traverse and grow within an extremely dense three-dimensional barrier composed of ECM proteins (Even-Ram et Yamada, 2005 ; Hanahan et Weinberg, 2000). Recently, MT1-MMP-mediated pericellular proteolysis of the ECM has emerged as an essential mechanism by which tumor cells circumvent the mechanical coercion imposed by these three-dimensional barriers and acquire the ability to invade and proliferate within this growth-restrictive environment (Hotary *et al.*, 2003). The results presented in the current paper suggest that this proteolytic event must also be tightly coupled to intracellular signaling events in order to sustain proliferation of tumor cells in 3D matrices, of which tyrosine phosphorylation of MT1-MMP may play a prominent role. Identification of proteins that specifically interact with tyrosine phosphorylated MT1-MMP, which is currently underway, should provide important information on the intracellular signaling pathways responsible for the coupling of MT1-MMP-mediated pericellular proteolysis to tumor cell proliferation.

Acknowledgements

We thank Marie-Paule Lachambre for helpful advice on flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction.

References

Voir page 180.

Legends to figures

Figure 1. Impairment of MT1-MMP tyrosine phosphorylation alters cell morphology of HT-1080 fibrosarcoma cells. HT-1080 cells were stably transfected with wild type MT1-MMP (MT1 WT), its non-phosphorylatable version (MT1 Y573F), or with the empty vector (pcDNA). For 2D growth, stable transfectants were seeded atop of a collagen film, and for 3D growth, cells were embedded within collagen gels (3D). (A) Total cellular content of MT1-MMP and phosphoMT1-MMP was assessed by Western Blot; IP: immunoprecipitation, ID: immunodetection, H: immunoglobulin heavy chain. (B) MT1-MMP cell surface expression was monitored by flow cytometry. Black areas represent the control isotype (IgG), grey lines represent MT1-MMP. (C) Stable transfectants were grown in 3D collagen matrix during 5 days. Cells were harvested for mRNA isolation and equal amount were used to prepare cDNA, which was used to assess MT1-MMP gene expression by qPCR. MT1-MMP mRNA expression was normalized with β -actin expression as internal control. (D) Stable transfectants were grown in 3D collagen matrix during 5 days and confocal images were obtained from paraffin-embedded sections, as described in the Material and Methods section. The white scale bar represents 50 μ m.

Figure 2. Inhibition of tumor cell proliferation in 3D collagen matrices by a non-phosphorylatable MT1-MMP mutant. HT-1080 cells were stably transfected with wild type MT1-MMP (MT1 WT), its non-phosphorylatable version (MT1 Y573F), or with the empty vector (pcDNA). For 2D growth, stable transfectants were seeded (5×10^5 cells) atop of a collagen film, and for 3D growth, 15×10^3 cells were embedded within collagen gels (3D). (A) Time-dependent cell proliferation of HT-1080 transfectants in 2D and 3D collagen matrices. Cells were allowed to grow on 2D or within 3D collagen matrices during the indicated periods of time. (B) Cells were double-stained with annexin V/propidium iodine for viability/apoptosis analysis. (C) MT1-MMP-dependent 3D growth was determined by the use of TIMP-1 (broad MMP inhibitor, except MT1-MMP), TIMP-2 and GM6001 (broadly active MMP inhibitor). Cells were allowed to grow on 2D/3D collagen matrix during 5 days. (D) Determination of MT1-MMP catalytic activity. Conditioned media were analyzed for MT1-MMP-dependent activation of MMP-2 by zymography and hydroxyproline (collagen

degradation product) content. n.d.: not detected. Data are means \pm SD, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3. Cell cycle analysis of HT-1080 cells expressing wild type MT1-MMP or Y573F mutant in 2D and 3D collagen matrices. HT-1080 cells stably transfected with wild type MT1-MMP (MT1 WT), its non-phosphorylatable form (MT1 (Y573F)) or with the empty vector (pcDNA) were allowed to grow atop of collagen film (2D) or within collagen gel (3D) during 5 days. Cells were then extracted from 2D and 3D collagen matrices. (A) Cells were analysed for cell cycle by flow cytometry. (B) Total cellular content of cell cycle markers was assessed by Western Blot. (C) Aneuploidy was determined by analysis of DNA content. Data are means \pm SD, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, ns: $P > 0.05$, non significant.

Figure 4: Inhibition of tumor cell invasion of collagen gels by a non-phosphorylatable MT1-MMP. HT-1080 cells were stably transfected with wild type MT1-MMP (MT1 WT), its non-phosphorylatable version (MT1 Y573F), or with the empty vector (pcDNA). (A) 5×10^4 cells seeded in Transwells were allowed to invade collagen gel (0.5mg/mL) during 48 h. (B) 2×10^4 cells were allowed to invade dense collagen gel (2.2 mg/mL) during 8 days. Cross-sections of gels were stained with hematoxylin, phloxin and saffron (HPS). Blue dotted lines are the top of the collagen gels. Data are means \pm SD, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$, ns: $P > 0.05$, not significant. Scale bar represents 100 μ m.

Figure 5: Inhibition of anchorage-independent growth by a non phosphorylatable MT1-MMP. HT-1080 cells were stably transfected with wild type MT1-MMP (MT1 WT), its non-phosphorylatable version (MT1 Y573F), or with the empty vector (pcDNA). Cells were allowed to grow in 0.35% soft agar during 15 days. Macroscopic colonies (visible to the naked eye) and microscopic colonies were counted.

Figure 6. Inhibition of tumor growth by the non-phosphorylatable MT1-MMP mutant. 5×10^6 HT-1080 cells stably transfected with wild type MT1-MMP (MT1 WT), its non-phosphorylatable version (MT1 Y573F), or with the empty vector (pcDNA) were implanted

subcutaneous in athymic nude mice. (A) Xenografts size after 34 days. n=8 for pcDNA, n=7 for wild type MT1-MMP (MT1 WT), n=6 for each clone of Y573F MT1-MMP (MT1 (Y573)a and MT1 (Y573)b). (B) Histological analysis and immunostaining of paraffin-embedded wild type MT1-MMP- derived xenografts 34 days post-implantation. (C) Histological analysis and immunostaining of paraffin-embedded lesions derived from wild type MT1-MMP- or the Y573F mutant- expressing fibrosarcoma cells 6 days post-implantation. *P<0.05; **P<0.01. Black scale bar represents 50 μ m; yellow scale bar represents 1 mm.

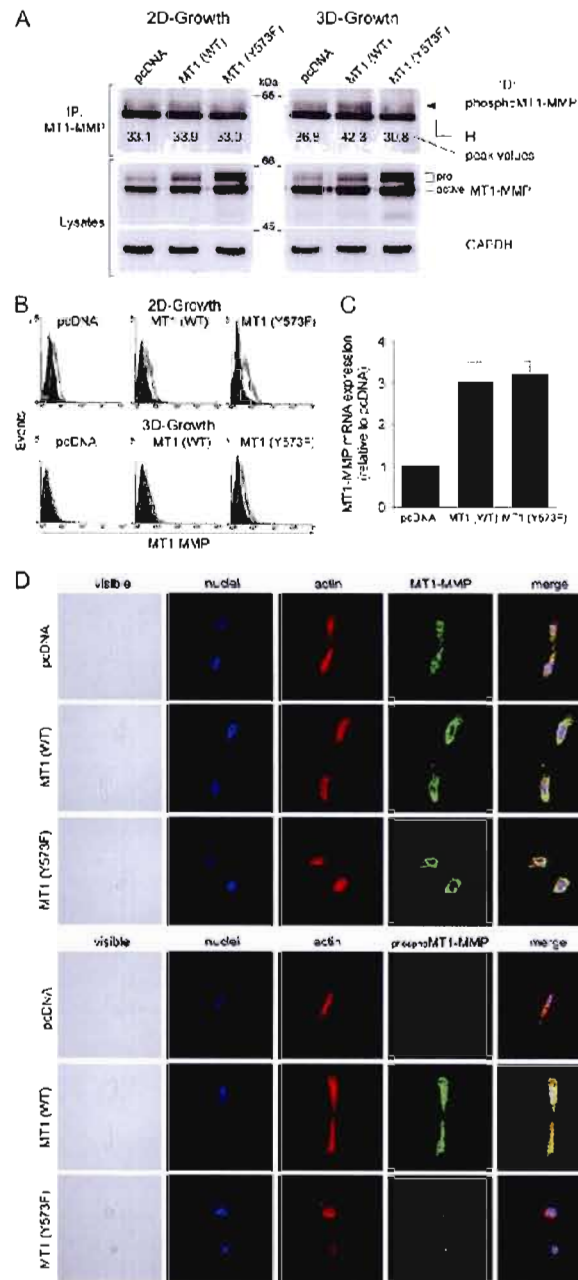


Figure 1. Impairment of MT1-MMP tyrosine phosphorylation alters cell morphology of HT-1080 fibrosarcoma cells. Nyalendo *et al.*, 2008. *Carcinogenesis*. Vol. 29, p. 1655-1664.

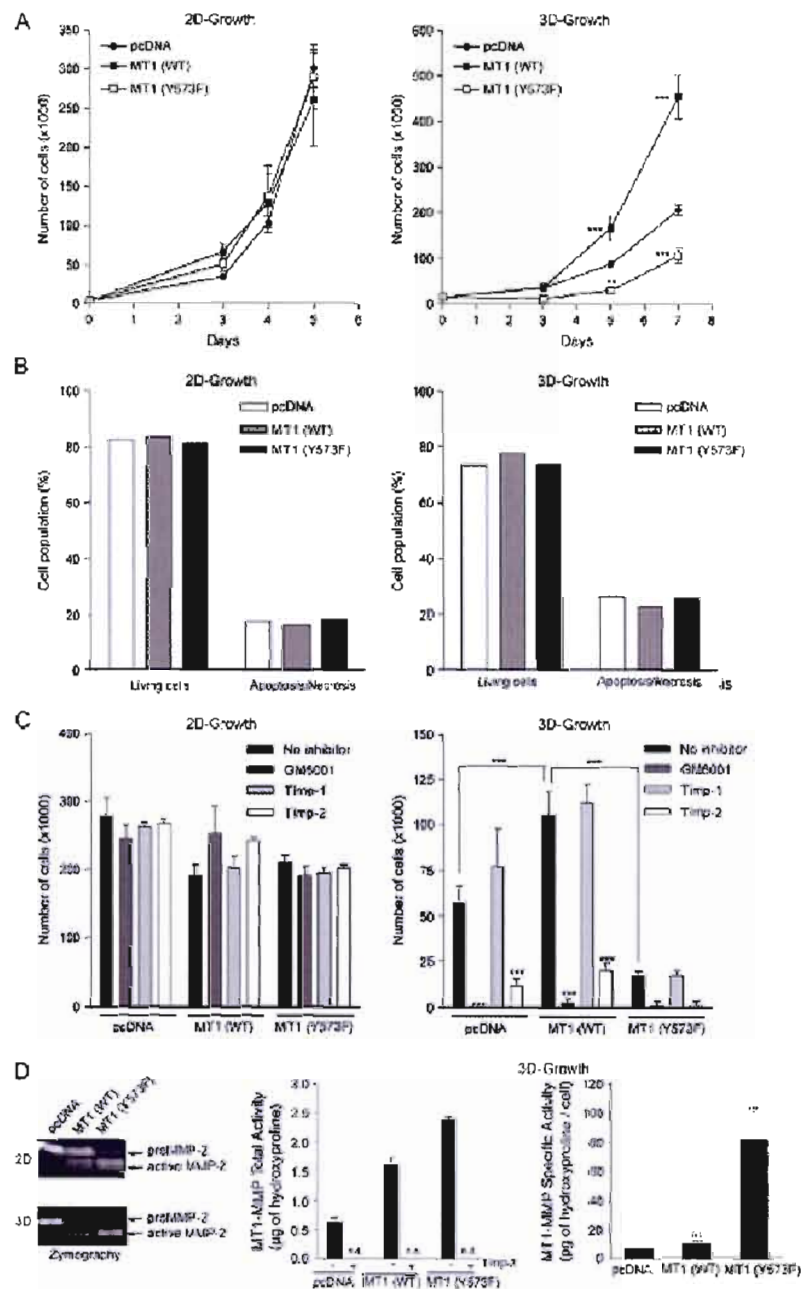


Figure 2. Inhibition of tumor cell proliferation in 3D collagen matrices by a non phosphorylatable MT1-MMP mutant.

Nyalendo *et al.*, 2008. *Carcinogenesis*. Vol. 29, p. 1655-1664.

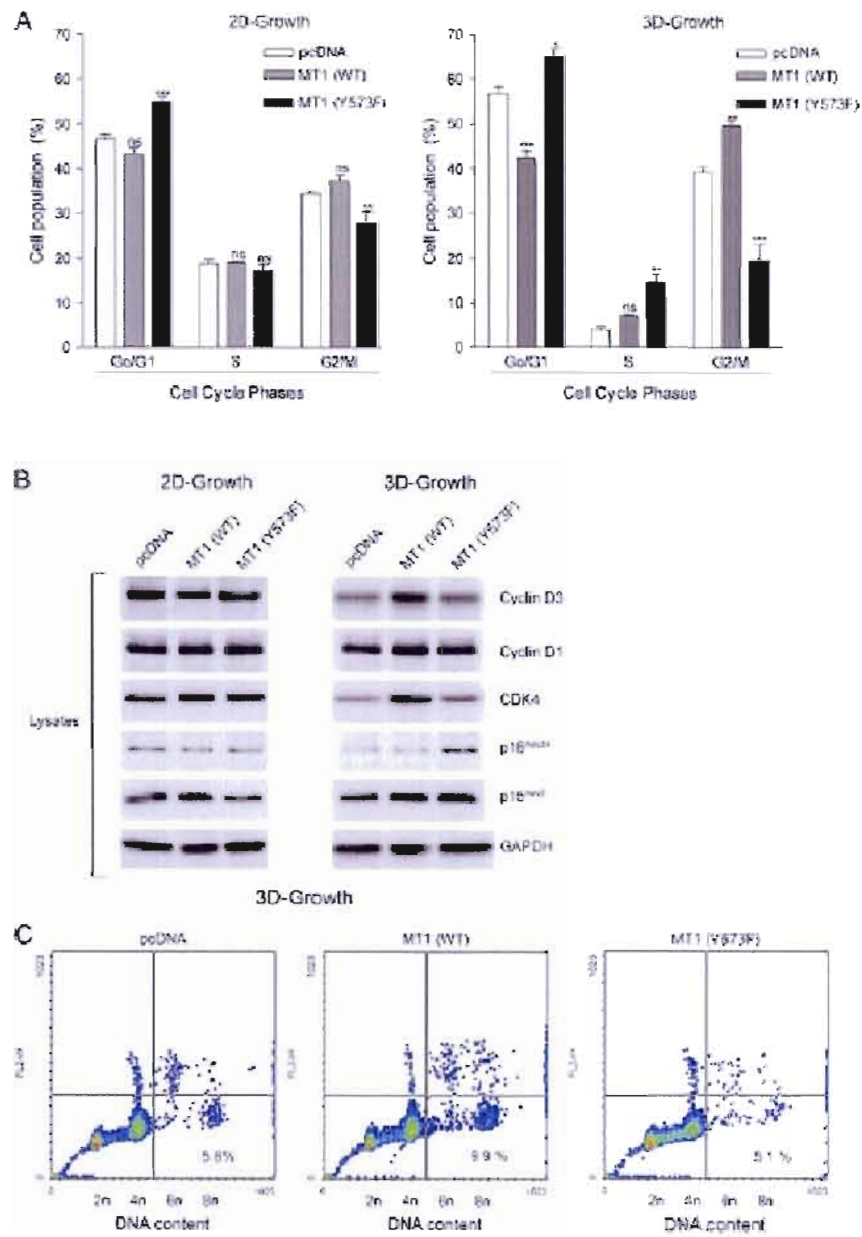


Figure 3. Cell cycle analysis of HT-1080 cells expressing wild-type MT1-MMP or Y573F mutant in 2D and 3D collagen matrices.

Nyalendo *et al.*, 2008. *Carcinogenesis*. Vol. 29, p. 1655-1664.

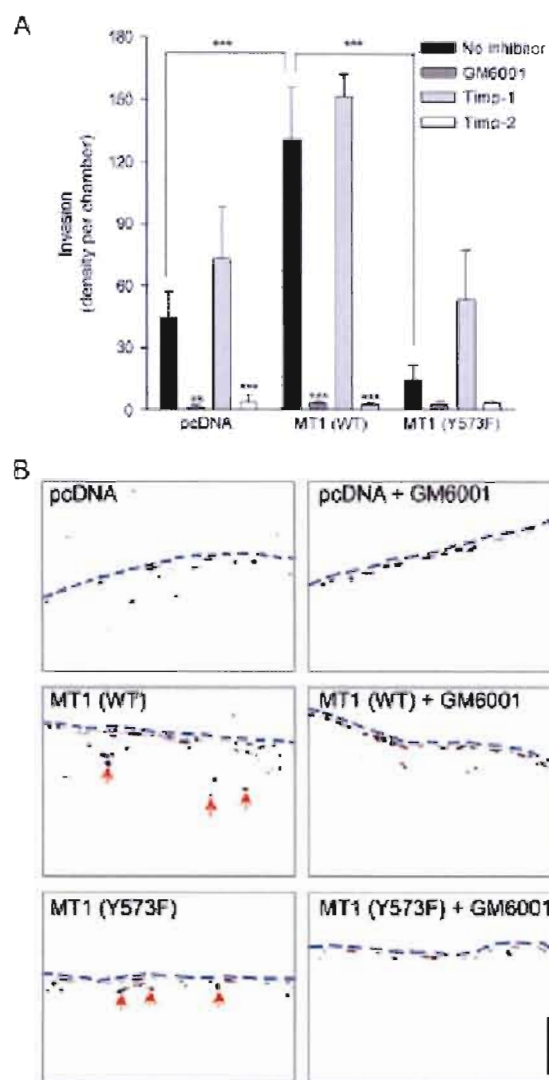


Figure 4. Inhibition of tumor cell invasion of collagen gels by a non phosphorylable MT1-MMP.

Nyalendo *et al.*, 2008. *Carcinogenesis*. Vol. 29, p. 1655-1664.

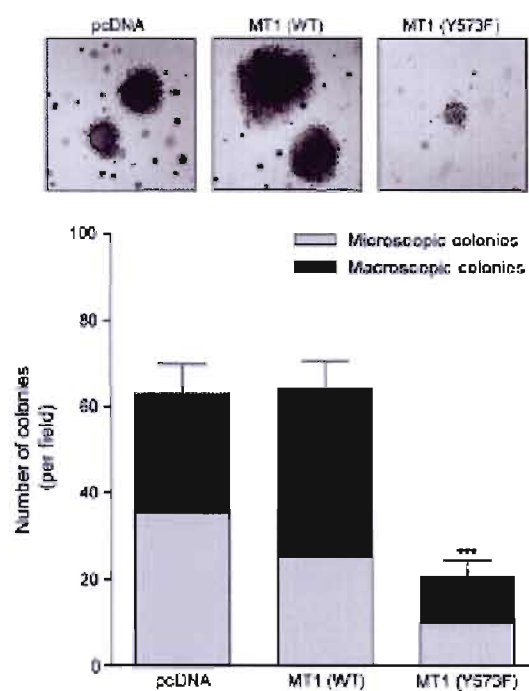


Figure 5. Inhibition of anchorage-independent growth by a non phosphorylable MT1-MMP. Nyalendo *et al.*, 2008. *Carcinogenesis*. Vol. 29, p. 1655-1664.

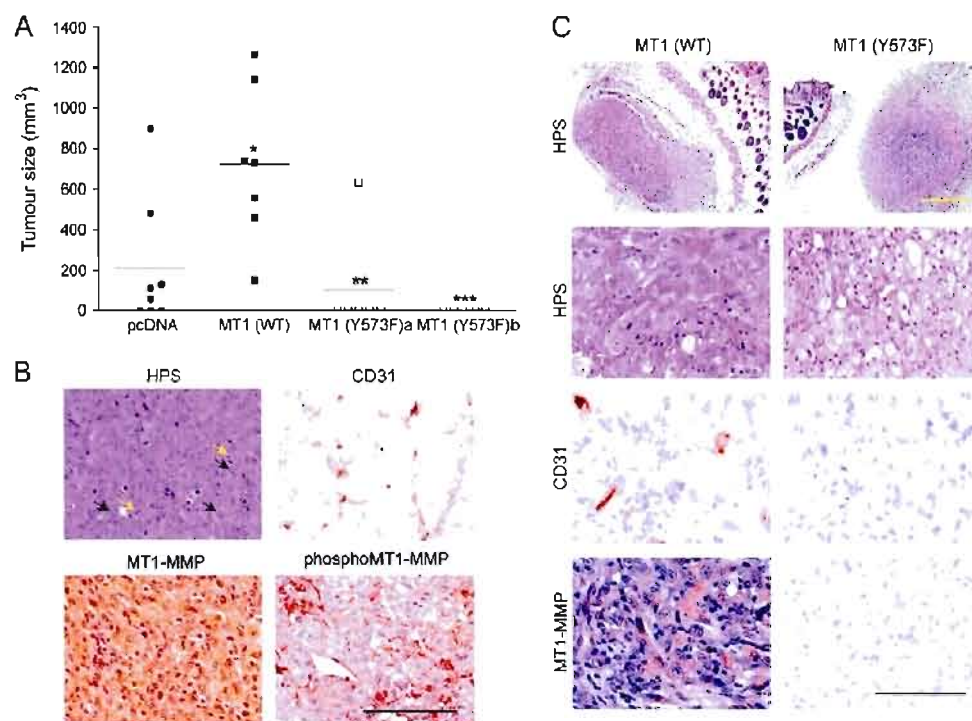


Figure 6. Inhibition of tumor growth by the non phosphorylable MT1-MMP mutant.

Nyalendo *et al.*, 2008. *Carcinogenesis*. Vol. 29, p. 1655-1664.

4.3 Identification de la MT1-MMP phosphorylée en association avec la progression du neuroblastome.

Résumé

Le neuroblastome est une tumeur pédiatrique des cellules de la crête neurale qui est caractérisée cliniquement par son évolution variable, allant de la régression spontanée à la malignité. La métalloprotéase matricielle de type membranaire 1 (MT1-MMP), une enzyme impliquée dans plusieurs processus de la progression tumorale, a été associée dans des études précédentes à un mauvais pronostic chez les patients atteints de neuroblastome. En se basant sur notre récente démonstration que la phosphorylation de la MT1-MMP est impliquée dans la croissance tumorale du fibrosarcome, nous avons exploré dans la présente étude le rôle de la MT1-MMP phosphorylée dans la progression du neuroblastome. Pour ce faire, la MT1-MMP phosphorylée a été immunomarquée sur des échantillons de *tissue microarray* provenant de 55 patients atteints de neuroblastome détecté par dépistage de masse, et de 234 patients atteints de neuroblastome détecté de façon standard. De plus, l'effet d'une version non phosphorylable de la MT1-MMP sur la migration et la prolifération des cellules de neuroblastomes dans des matrices tridimensionnelles de collagène a été examiné. Nous montrons dans cette étude que la MT1-MMP phosphorylée est préférentiellement exprimée dans les neuroblastomes standard, alors qu'elle est faiblement exprimée dans les neuroblastomes provenant de dépistage de masse ($P = 0.0006$), et dans les échantillons de neuroblastomes provenant de patients âgés de moins de un an ($P = 0.0002$). De plus, nous avons observé que l'altération de la phosphorylation de la MT1-MMP réduisait la migration et la prolifération des cellules de neuroblastomes dans des matrices tridimensionnelles de collagène. Ainsi, la phosphorylation de la MT1-MMP sur sa tyrosine intracellulaire semble être importante pour la progression du neuroblastome et son expression est associée à un mauvais pronostic pour les patients atteints de neuroblastome.

ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION D'UN ARTICLE DANS UNE THÈSE

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.


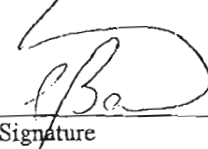

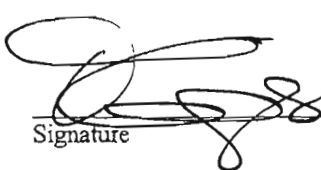

Nous entérinons que Carine Nyalendo

est l'auteur principal de l'article intitulé :

Identification of membrane-type 1 matrix metalloproteinase tyrosine phosphorylation in association with neuroblastoma progression. Nyalendo C, Sartelet H, Barette S, Ohta S, Gingras D, Béliveau R. 2009. Manuscrit en revision dans *BMC Cancer*.

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse.

Co-auteur(s)

1) <u>Sartelet, Hervé</u> Nom, prénom	 Signature	<u>9-1-13</u> Date
2) <u>Barrette Stéphane</u> Nom, prénom	 Signature	<u>9-1-13</u> Date
3) <u>Ohta Shigeru</u> Nom, prénom	 Signature	<u>Jan 14, 2009</u> Date
4) <u>Gingras, Denis</u> Nom, prénom	 Signature	<u>13-1-2009</u> Date
5) <u>Béliveau, Richard</u> Nom, prénom	 Signature	<u>21/01/09</u> Date

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

J'ai personnellement effectué la recherche bibliographique, la planification expérimentale, la réalisation des expériences et la rédaction du manuscrit. Les Drs. Stéphane Barette (Oncologue au CHU Sainte-Justine à Montréal) et Shigeru Ohta (Pédiatre, Shiga University of Medical Science, Japon) ont fourni les tissus des patients. Le Dr Hervé Sartelet, pathologiste au CHU Sainte-Justine, a construit les "Tissue Microarray" et effectué les immunomarquages.

Le Dr Denis Gingras est le superviseur du projet et a étroitement contribué à son élaboration et à la révision du manuscrit.

Le Dr Richard Béliveau est mon directeur de thèse. Il m'a guidé aux niveaux conceptuel et technique dans la réalisation du projet.

ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

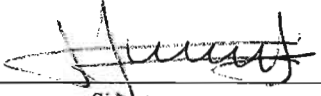
L'auteur principal de l'article intitulé :

Identification of membrane-type 1 matrix metalloproteinase tyrosine phosphorylation in association with neuroblastoma progression.

soumis pour publication ☒ accepté pour publication ☐ ou publié ☐ dans : BMC Cancer,

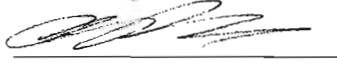
est : **Carine Nyalendo**

Auteur principal Nyalendo, Carine
Nom, Prénom


Signature

21/01/03
Date

Directeur de recherche Béliveau, Richard
Nom, Prénom


Signature

21/01/03
Date

*Manuscript***4.3 Identification of phosphorylated membrane-type 1 matrix metalloproteinase in association with neuroblastoma progression.**

Carine Nyalendo¹, Hervé Sartelet², Stéphane Barrette³, Shigeru Ohta⁴, Denis Gingras¹,
Richard Béliveau^{1§}

¹Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8, CANADA

²Département de Pathologie, CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, CANADA

³Département de pédiatrie CHU Sainte-Justine, Montréal, Québec, CANADA

⁴Department of Pediatrics, Shiga University of Medical Science, Otsu, Shiga, JAPAN

[§]Corresponding author

Email addresses: CN: carinenyalendo@recherche-ste-justine.qc.ca;

HS: herve.sartelet.hs@ssss.gouv.qc.ca;

SB: stephane.barrette@umontreal.ca;

SO: ohata@belle.shiga-med.ac.jp;

DG: denis.gingras@recherche-ste-justine.qc.ca;

RB: oncomol@nobel.si.uqam.ca

Abstract

Background

Neuroblastoma is a pediatric tumor of neural crest cells that is clinically characterized by its variable evolution, from spontaneous regression to malignancy. Despite many advances in neuroblastoma research, 60% of neuroblastoma, which are essentially metastatic cases, are associated with poor clinical outcome due to the lack of effectiveness of current therapeutic strategies. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP, MMP-14), an enzyme involved in several processes of tumor progression, has previously been shown to be associated with poor clinical outcome of neuroblastoma. Based on our recent demonstration that MT1-MMP phosphorylation is involved in the growth of fibrosarcoma tumors, we examined the potential role of phosphorylated MT1-MMP in neuroblastoma progression.

Methods

Tyrosine phosphorylated MT1-MMP was immunostained on tissue microarray samples from 55 patients with neuroblastoma detected by mass screening (known to be predominantly associated with favourable outcome), and 234 patients with standard diagnosed neuroblastoma. In a second time the effect of a non phosphorylable version of MT1-MMP was investigated in neuroblastoma cell migration and proliferation within three-dimensional collagen matrix.

Results

Although there is no correlation between tyrosine phosphorylated MT1-MMP (pMT1-MMP) and MYCN amplification or clinical stage, we observed that pMT1-MMP is preferentially expressed in standard neuroblastoma, while it is poorly expressed in neuroblastoma from mass screening samples ($P = 0.0006$), and in neuroblastoma samples from patients younger than one year ($P = 0.0002$). In vitro experiments showed that overexpression of a non phosphorylable version of MT1-MMP reduces MT1-MMP-mediated neuroblastoma cell migration and proliferation within a three-dimensional type I collagen matrix, suggesting a role of the phosphorylated enzyme in the invasive properties of neuroblastoma cells.

Conclusions

Overall, these results suggest that tyrosine phosphorylated MT1-MMP may play an important role in neuroblastoma progression and that its expression is preferentially observed in tumor specimens from neuroblastoma patients showing poor clinical outcome.

Background

Neuroblastoma (NB) is the most common extracranial solid cancer in childhood, accounting for 15% of all cancer-related fatalities in children (Gurney *et al.*, 1995). NB is a neuroendocrine malignant tumor of the autonomic nervous system that arise from neural crest cells (Schwab *et al.*, 2003). NB shows heterogeneous pathological characteristics due to its variable sites of origin, diverse histopathologic appearance and biologic characteristics. This malignant tumor exhibits a broad spectrum of clinical features, including spontaneous regression without any treatment, maturation to a benign ganglioneuroma, or progression to metastasis leading to death. Numerous factors, such as patient's age at diagnostic, stage of disease, tumor histopathology and genetic abnormalities have all been shown to influence NB progression (Maris, 2005). Among them, the metastatic status (Stage 4) is a very strong prognosis factor of poor outcome. Survival of children older than one year with an advanced stage of NB is poor despite aggressive treatment, as opposed to the survival of children younger than one year (Robison *et al.*, 2005). NB secretes catecholamine metabolites that are excreted in urine, offering a non-invasive diagnostic technique. This observation has led to consider screening for NB in infants using specific catecholamine markers. Large studies showed that mass screening does not appear to reduce neither the disease-related mortality nor the yearly numbers of aggressive NB (Barrette *et al.*, 2007 ; Schilling *et al.*, 2002 ; Woods *et al.*, 2002). Moreover, patients with mass screening NB died very rarely from tumor progression (Barrette *et al.*, 2006). Although the mechanisms underlying NB progression have been under intense investigation, therapeutics advances have failed to significantly increase the survival rates of children with aggressive NB.

Matrix metalloproteinases (MMPs), a family of zinc-dependent endopeptidases that degrade extracellular matrix (ECM) components, play crucial roles in several processes underlying tumor progression, including cell attachment, cell migration, invasiveness, cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis (Edwards et Murphy, 1998 ; Egeblad et Werb,

2002 ; Folgueras *et al.*, 2004 ; van Hinsbergh, Engelse et Quax, 2006). There are 23 different human MMPs described to date, some of these enzymes being secreted in the pericellular environment while others are associated with the cell membrane. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP, MMP-14), the most characterized membrane-anchored MMP, plays essential roles in tumor cell migration and invasion by acting as a potent matrix-degrading protease that proteolyses a broad spectrum of ECM proteins (d'Ortho *et al.*, 1997 ; Hiraoka *et al.*, 1998 ; Pei et Weiss, 1996) as well as a number of cell surface-associated adhesion receptors (Belkin *et al.*, 2001 ; Kajita *et al.*, 2001). In particular, elegant studies have unequivocally shown that MT1-MMP-mediated pericellular proteolysis of the ECM is essential for tissue-invasive activity of tumor cells (Sabeh *et al.*, 2004) as well as for tumor cell growth in otherwise growth-restrictive three-dimensional (3-D) environment (Hotary *et al.*, 2003). Accordingly, MT1-MMP is overexpressed in many types of tumors, including breast, colon, head and neck (Okada *et al.*, 1995), cervical (Zhai *et al.*, 2005), gastric (Nomura *et al.*, 1995) and lung (Tokuraku *et al.*, 1995) carcinomas, as well as in brain tumors (Nakada *et al.*, 1999). Moreover, the enzyme expression has been shown to correlate with unfavourable outcome in pediatric NB patients (Sakakibara *et al.*, 1999).

In addition to its important matrix-degrading activity, MT1-MMP contains a short cytoplasmic sequence that is involved in the regulation of the enzyme activity (Uekita *et al.*, 2001) as well as to the activation of signal transduction processes (D'Alessio *et al.*, 2008 ; Gingras *et al.*, 2001). Previous work of our laboratory have also shown that MT1-MMP is phosphorylated on its unique cytoplasmic tyrosine residue and that this event also participates to tumor cell migration and invasion (Gingras *et al.*, 2008 ; Nyalendo *et al.*, 2007). In this respect, we reported that impaired tyrosine phosphorylation of MT1-MMP markedly reduces the tumorigenic properties of the highly invasive HT-1080 fibrosarcoma, leading to a complete inhibition of tumor growth in nude mice (Nyalendo *et al.*, 2008).

The aim of this study was to investigate the role of tyrosine phosphorylated MT1-MMP (pMT1-MMP) in NB progression and its relation to clinical outcome. We report herein that tyrosine phosphorylation of the enzyme plays an important role in NB cell migration and proliferation within 3D collagen matrix *in vitro*. Furthermore, expression of pMT1-MMP correlates with some clinical features, patient's age at diagnosis and mass screening versus standard NB, associated with poor prognostic in NB pediatric patients.

Patients and Methods

Patients

All tumor samples used in this study were obtained at diagnosis. Tumor samples from **mass screening** NB from 55 patients were collected in two different countries: 35 came from Québec (Canada) and 20 from Otsu (Japan, (Hase *et al.*, 2002)) (Table 1). Tumors were diagnosed between August 1989 and April 2002 with a median follow-up of 170 months. Among these 55 patients, there were 26 girls and 29 boys with a median age of 7 months. Three patients were older than one year at diagnosis and one tumor had MYCN amplification. According to the International Neuroblastoma Staging System classification (Brodeur *et al.*, 1988), there were 16 patients in stage 1, 15 in stage 2, 9 in stage 3, 6 in stage 4 and 9 in stage 4S. One patient died from NB. Tumors samples from **standard NB** came from 234 patients with NB treated and followed in four centers: Bicêtre hospital (Le Kremlin-Bicêtre, France), Gustave Roussy Institute (Villejuif, France) and the American Hospital (Reims, France) and CHU Sainte-Justine (Montréal, Canada). These patients were diagnosed between July 1988 and March 2008, with a median follow-up of 58.5 months. 167 patients were still alive at the last follow-up. There were 114 boys and 120 girls, with a median age of 25 months. Seventy three patients were under one year of age and 40 were older than 5 at the time of diagnosis (Table 1). There were 52 patients in stage 1, 32 in stage 2, 35 in stage 3, 97 in stage 4 and 18 in stage 4S. The global survival at the end of the follow-up was 91.7% in patients under one year, 65.2% in patient of one to five years and 52.5% in those of more than five years. Stage related global survival (according to Kaplan-Meier method) was 94.2% in stage 1, 100% in stage 2, 85.7% in stage 3, 42.2% in stage 4 and 83.3% in stage 4S (Table 1).

Tissue Microarray (TMA) construction

On average, 4 tissue cylinders with a 0.6 mm diameter were obtained and transferred into a recipient paraffin block using a manual tissue arrayer (Alphelys, Plaisir, France). Mass screening NB samples consisted of 55 primary tumors and 21 metastases (15 lymph nodes and 6 hepatic metastases). TMA blocks of standard NB contained 234 primary tumors and 78 metastases (68 lymph nodes, 8 hepatic and 2 cutaneous metastases) and 56 paired control normal tissues (40 adrenal glands and 16 sympathetic ganglia).

Immunohistochemistry

Five- μ m sections of TMA blocks were cut and deparaffinized, treated with 1% H_2O_2 , and submitted to antigen retrieval by microwave oven treatment for 15 min in citrate buffer. Immunohistochemical staining was performed on these sections using pMT1-MMP polyclonal antibodies (1/100, 1 hour at room temperature (Nyalendo *et al.*, 2008 ; Nyalendo *et al.*, 2007)). Samples were then incubated with biotinylated immunoglobulin (LSAB II, DAKO, Glostrup, Denmark) at room temperature for 30 min followed by avidin-biotin peroxidase complexes for 30 min. Rabbit IgG was used as a negative control. Three-amino-9-ethylcarbazol was used as the chromogen and haematoxylin as the nuclear counterstain. TMA sections were treated in one set of immunostaining. Two pathologists blinded from clinical data independently evaluated immunostaining under a light microscope at a magnification of 400X. Immunostaining scores were established by a semi-quantitative optical analysis of samples containing more than 10 neuroblasts assessing the percentage of positive cells in each sample: 0 = all cells negative, 1+ = 1 to 25% of positive cells, 2+ = 26 to 50% of positive cells, 3+ = 51 to 75% of positive cells and 4+ more than 76% of positive cells. Inter-observer agreement was calculated by the kappa coefficient. The observed agreement between the two pathologists was Kappa = 0.61, 95% CI = [0.58-0.64], $P < 0.0001$.

Statistical analysis

The univariate relationship between immunohistochemical expression of pMT1-MMP and biological and clinical data (standard and mass screening NB, control samples, primary tumors, metastasis, stage 1 and stage 4 and patient under one year, MYCN amplification) was investigated by t-student tests. The Kaplan–Meier analysis was used to estimate cancer-specific survival, and the groups were compared with the log-rank test. All analyses were performed with Graphpad Prism software. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Cell lines and transfection

NB-10 cells were from St Jude Children's Research Hospital (Memphis, TN, USA) and were a gift from Dr. Daniel Sinnett (CHU Sainte-Justine, Montreal). SK-N-SH cells were obtained from the American Type Culture Collection. Cells were cultured at 37°C in a humidified atmosphere composed of 95% air and 5% CO₂ and were grown in Eagle's minimum essential medium (EMEM) supplemented with 1 mM sodium pyruvate and 10% fetal bovine serum (FBS). The cDNAs encoding the full-length human MT1-MMP (MT1 WT) and its cytoplasmic mutant (MT1 Y573F) have been previously described (Nyalendo *et al.*, 2007). NB-10 and SK-N-SH neuroblastoma cells were transiently transfected using the FuGENE HD transfection reagent (Roche Applied Science) according to the manufacturer's instructions.

Western Blotting

The procedures have been described previously (Labrecque *et al.*, 2004). Briefly, equal amounts of proteins from cell lysates were solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 5 min, separated by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes and immunodetected with antibodies against MT1-MMP (MAB3328, Chemicon International) or GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). For phosphorylated MT1-MMP assessment, cell lysates were immunoprecipitated with MT1-MMP antibodies (MAB3328) prior western blot procedure and immunodetection with pMT1-MMP polyclonal antibodies (Nyalendo *et al.*, 2007).

Cell Migration Assay

Migration assays were performed on transwells pre-coated with 10 µg/ml type I collagen. Transwells were assembled in 24-well plates, and the lower chambers were filled with EMEM containing 10% FBS. Transfected cells were harvested, resuspended in 100 µl of fresh serum-free EMEM at a density of 5×10^5 cells/ml, and inoculated into the upper chamber of each transwell. The plates were then placed at 37 °C in 5% CO₂, 95% air for 3 h, and cells that had migrated were quantified using computer-assisted imaging (Northern Eclipse 6.0; Empix Imaging, Mississauga, ON, Canada). Statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-tests using the GraphPad Prism software. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

3D cell proliferation

Type I collagen was extracted from rat tail and resuspended at 2.7 mg/ml in acetic acid. Cells were mixed with 10X EMEM, 0.17N NaOH and 2.7 mg/ml type I collagen. The

mixture was allowed to gel for 45 min at 37°C and EMEM containing 10% FBS was added atop. Collagen gels were dissolved with 2 mg/ml bacterial collagenase (Sigma, Burlington, ON, Canada) and viable cells were counted by trypan blue exclusion using a hemacytometer. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by the Bonferroni post-tests using GraphPad Prism program. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Fluorescence and Confocal Microscopy

NB-10 cells were seeded on 10 µg/ml type I collagen-coated cover-slips, serum-starved overnight and stimulated with serum for 15 min. Cells were then fixed with 3.7% formaldehyde for 15 min, incubated for 5 min with 20 µM Hoechst (Sigma) for nuclei staining, permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 5 min and blocked (1% BSA in Tris Buffer Saline containing 0.1% Tween 20) for 30 min. Samples were then incubated with FITC-conjugated phalloidin (for actin staining) for 30 min, and stained with specific primary antibodies against pMT1-MMP (Nyalendo *et al.*, 2007) for 30 min, followed by a 30 min-incubation with rhodamine-conjugated secondary antibodies (Molecular Probes – Invitrogen, Burlington, ON, Canada). Samples were covered with Immuno-Fluore Mounting Medium (MP Biomedicals, Solon, OH, USA). Fluorescence was visualized and photographed using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

Results and Discussion

Expression of phosphorylated MT1-MMP in NB specimens

NB is characterized by its variable evolution that can be separated in two major groups. Tumors in the first group are relatively benign, localized, well-differentiated and are successfully treated by surgery alone or sometimes regress spontaneously. Tumors in the second group (60 % of all NB) are invasive and metastatic, and are usually associated with poor clinical outcome in spite of intensive treatment (Ribatti *et al.*, 2002). Tumors detected by mass screening are part of the first group and are associated with good clinical outcome. Notwithstanding many advances in the identification of the molecular factors associated with the poor clinical income of NB, including amplified expression of *MYCN* oncogene, deletion of 1p or 11q (Ishola et Chung, 2007), lack of CD44 expression (Ara et DeClerck, 2006) as well as expression of neurotrophin receptors (Schwab *et al.*, 2003), the molecular mechanisms responsible for the progression/regression evolution of NB are poorly understood.

Since previous study showed a correlation between MT1-MMP expression and advanced stage of NB and patients survival (Sakakibara *et al.*, 1999), we examined in this study whether expression of pMT1-MMP was implicated in NB progression. 289 NB samples (Table 1) were immunostained with pMT1-MMP antibodies (Nyalendo *et al.*, 2008 ; Nyalendo *et al.*, 2007). The expression of pMT1-MMP was membranous and cytoplasmic and was only found in neuroblastic cells (Fig. 1). As shown in Fig. 1, normal control samples presented a poor and infrequent expression of pMT1-MMP (33.9% of sample, means intensity 0.34), NB had a moderate and frequent expression of pMT1-MMP (64.7% of sample, means intensity 0.72) similar to those of metastases (73.8% of sample, means intensity 0.72)

Relationship between pMT1-MMP and clinicopathologic parameters

We next evaluated the correlation between pMT1-MMP immunostaining and clinicopathologic features (Table 2). Analysis of immunostaining showed that pMT1-MMP is overexpressed in NB specimens compared to control samples ($P < 0.0001$). Indeed, immunostaining of pMT1-MMP was observed in 187 of 289 (64.7%) of NB specimens, while only 19 of 56 (33.9%) of normal specimens were positive for MT1-MMP. The pMT1-MMP expression was significantly lower in mass screening NB (24 of 55 (43.6%)) than in standard NB (160 of 234 (68.4%), $P = 0.0006$). Moreover, pMT1-MMP expression was higher in patients older than 1 year than those under one year ($P = 0.0002$). However, no significant relationship was observed between pMT1-MMP expression and the tumor site (primary versus metastasis, $P = 0.5900$), clinical stage (stage 1 versus stage 4, $P = 0.3700$) or MYCN amplification (amplified versus no amplified $P = 0.1000$).

A non phosphorylable mutant of MT1-MMP inhibits MT1-MMP-mediated tumorigenic properties of NB in vitro

We have previously shown that tyrosine phosphorylation of MT1-MMP, in addition to its proteolytic activity, plays a critical role in the tumorigenicity of fibrosarcoma cells (Nyalendo *et al.*, 2008 ; Nyalendo *et al.*, 2007). To determine the role of phosphorylated MT1-MMP in NB *in vitro*, NB-10 and SK-N-SH NB cells were transiently transfected with either wild type (WT) or the non phosphorylable version (Y573F) of MT1-MMP. As shown in Fig. 2A, due to elevated basal expression of MT1-MMP in SK-N-SH cells, overexpression of WT MT1-MMP in these cells had a relatively low stimulatory effect on cell migration, while the Y573F mutant strongly diminished cell migration as well as MT1-MMP phosphorylation (Fig. 2A-B). However, in NB-10 cells, which express low basal levels of MT1-MMP, overexpression of WT MT1-MMP markedly increased cell migration (3-fold), this effect being completely abolished by overexpression of the Y573F mutant (Fig. 2B).

These results are in agreement with previous findings showing the dominant-negative properties of the non phosphorylable mutant of MT1-MMP (Nyalendo *et al.*, 2008 ; Nyalendo *et al.*, 2007).

We next evaluated the impact of MT1-MMP on NB proliferation within 3D collagen matrices. As shown in Fig. 2C, overexpression of the wild type version of the enzyme induced a marked increase in the proliferation of both SK-N-SH and NB-10 cells within 3D collagen matrices, this stimulatory effect being abolished by the non phosphorylable MT1-MMP mutant. Previous study from our laboratory demonstrate that the inhibitory effect of the Y573F dominant-negative mutant of MT1-MMP on tumor cell proliferation is not related to defective proteolysis, since this mutant retain the ability to activate proMMP-2 and to degrade type I collagen (Nyalendo *et al.*, 2008). The inhibitory effect of the Y573F mutant on NB cell migration and proliferation correlated with a decrease in the levels of phosphorylated MT1-MMP (Fig. 3). Moreover, serum-induced relocalization of tyrosine phosphorylated MT1-MMP to peripheral actin-rich structures, a process important for cell migration, was completely abolished by overexpression of the non phosphorylable mutant of MT1-MMP (Fig. 3, (Gingras *et al.*, 2008)).

These results suggest that phosphorylated MT1-MMP may play an important role in the MT1-MMP-mediated pro-migratory and pro-invasive properties of NB *in vitro*.

Conclusions

Overall, the findings reported in this study show that reduction of the tyrosine phosphorylation of MT1-MMP reduces MT1-MMP-mediated tumorigenic properties of NB cells *in vitro*, and that pMT1-MMP is preferentially expressed in tumor specimens from standard NB and in patients older than one year, two clinical features associated with poor outcome of NB patients. In addition, our previous findings suggest that phosphorylation of MT1-MMP is observed under tumorigenic rather than normal conditions (Nyalendo *et al.*, 2008). Therefore, phosphorylation of MT1-MMP could represent the “molecular switch” in NB cells responsible for the evolution from benign to malignant tumor. The identification of pMT1-MMP as an important player in the process of NB progression could be useful for the development of new therapeutics strategies for NB patients who cannot be cured with current therapeutic approaches.

Author's contributions

CN participated in the design of the study, carried out the *in vitro* experiments, participated in tissue microarray analysis and drafted the manuscript. HS carried out and analyzed the tissue microarray staining and performed the statistical analysis. SB and OS participated in the tissue microarray construction. DG participated to the design and coordination of the manuscript and helped to draft the manuscript. RB conceived of the study, and participated in its design and coordination. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

R.B. and D.G. hold a grant from the Canadian Institutes for Health Research to (Grant number MOP62918). CN hold a doctoral scholarship from the Canadian Natural Sciences and Engineering Research Council.

References

Voir page 180.

Figure legends

Figure 1: Immunostaining of pMT1-MMP in NB samples. pMT1-MMP was immunostained in tissue microarray of NB specimens.

Figure 2: Inhibition of neuroblastoma cell proliferation and invasion by a non phosphorylable mutant of MT1-MMP. NB-10 and SK-N-SH neuroblastoma cells were transfected with either pcDNA, WT or Y573F forms of MT1-MMP. 24h post-transfection, cells were harvested and transfection efficiency as well as MT1-MMP phosphorylation levels were determined by western blot (A); IP: immunoprecipitation, ID: immunodection, H: immunoglobulin heavy chain. (B) 5×10^4 transfected cells were subjected to migration assays, using transwells pre-coated with 10 $\mu\text{g/ml}$ type I collagen and 10% serum as chemoattractant. (C) 2×10^4 transfected cells were embedded within type I collagen gels and allowed to grow during 5 days. Data are means \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Figure 3: Localization of tyrosine phosphorylated MT1-MMP in NB cells. NB-10 neuroblastoma cells were transfected with either pcDNA, WT or Y573F forms of MT1-MMP. 24h post-transfection, cells were seeded on 10 $\mu\text{g/ml}$ type I collagen-coated cover slips, serum-starved for 18h, stimulated for 15 min with serum and fixed with formaldehyde. Nuclei, actin and pMT1-MMP were stained as described in Material and Methods. Pictures were acquired using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope. The white scale bar represents 50 μm .

Tables

Table 1 : Clinical features of 289 patients with NB diagnosis

<i>Characteristics</i>	Mass screening		Standard	
	<i>Number (%)</i>	<i>% Survival</i>	<i>Numbers (%)</i>	<i>% Survival</i>
Total	55 (100)	98	234 (100)	71.3
Gender				
Female	26 (47.3)		114 (48.7)	
Male	29 (52.7)		120 (51.3)	
Age				
Median (range) in months	30 (0-151)		25 (0-183)	
< 1 year	52 (94.5)	98	73 (31.2)	91.7
1-5 years	3 (5.5)	100	121 (51.8)	65.2
> 5 years			40 (17)	52.5
Clinical stage				
1	16 (29.1)	100	52 (22.2)	94.2
2	15 (27.2)	93	32 (13.7)	100
3	9 (16.4)	100	35 (15)	85.7
4	6 (10.9)	100	97 (41.4)	42.2
4S	9 (16.4)	100	18 (7.7)	83.3
MYCN oncogene				
< 10 copies	54 (98.2)	100	160 (82.9)	79.6
> 10 copies	1 (1.8)	0	33 (18.1)	53.1

Table 2 : Univariate analysis of pMT1-MMP expression in clinicopathologic features

<i>Characteristics</i>	<i>N*</i>	<i>Mean intensity</i>	<i>Positive N (%)</i>	<i>Negative N (%)</i>	<i>P</i>
Type of samples					
Normal control samples	56	0.34	19 (33.9)	37 (66.1)	
Tumor from primary site	289	0.72	187 (64.7)	102 (35.3)	0.0001
Tumor from metastasis	103	0.72	76 (73.8)	27 (26.2)	0.5900
Age					
< 1 year	125	0.64	58 (46.4)	67 (53.6)	0.0002
> 1 year	184	0.78	124 (67.4)	60 (32.6)	
Clinical stage					
I	68	0.66	41 (60.3)	27 (39.7)	0.3700
4	103	0.75	69 (67.0)	34 (33.0)	
Specimen type					
Mass screening	55	0.31	24 (43.6)	31 (56.4)	0.0006
Standard	234	0.8	160 (68.4)	74 (31.6)	
MYCN oncogene					
Amplified	34	0.52	21 (61.8)	13 (38.2)	0.1000
Not amplified	214	0.69	100 (46.7)	114 (53.3)	

*N: number of specimens

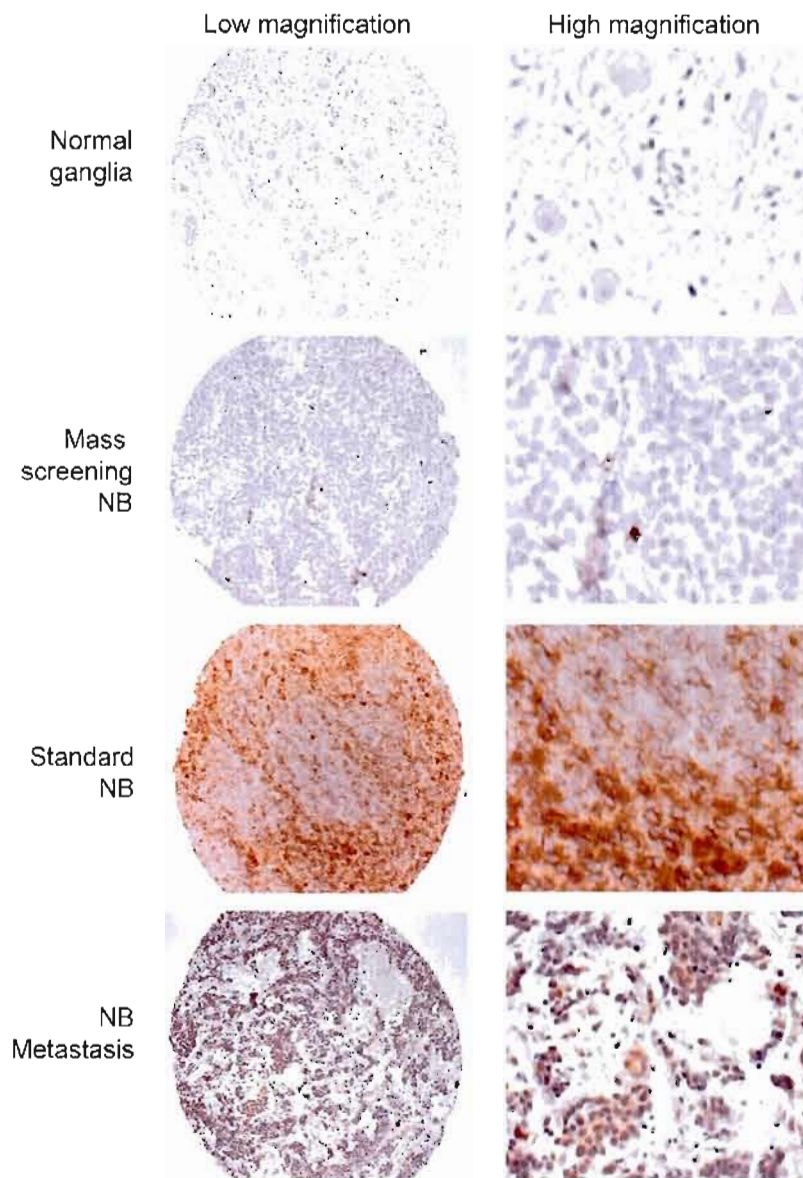


Figure 1. Immunostaining of pMT1-MMP in NB samples.

Nyalendo *et al.*, 2009. *BMC Cancer*, en révision.

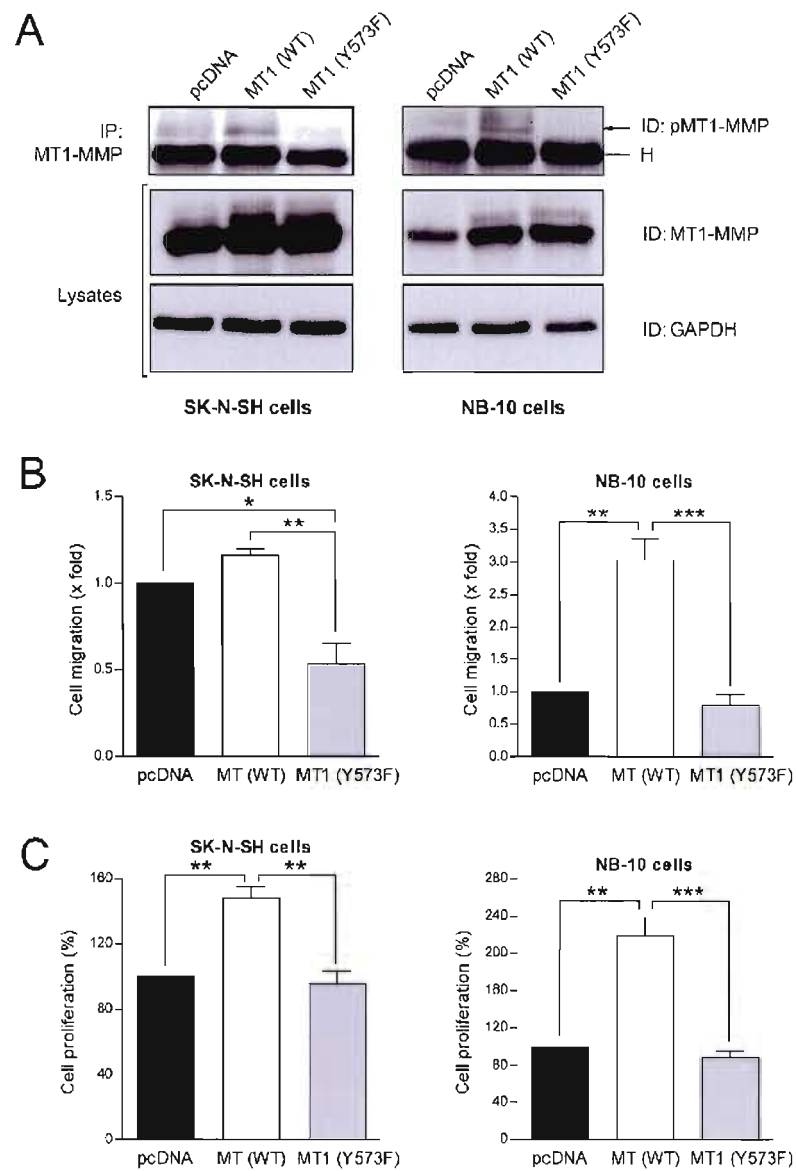


Figure 2. Inhibition of neuroblastoma cell proliferation and invasion by a non phosphorylable mutant of MT1-MMP.

Nyalendo *et al.*, 2009. *BMC Cancer*, en révision.

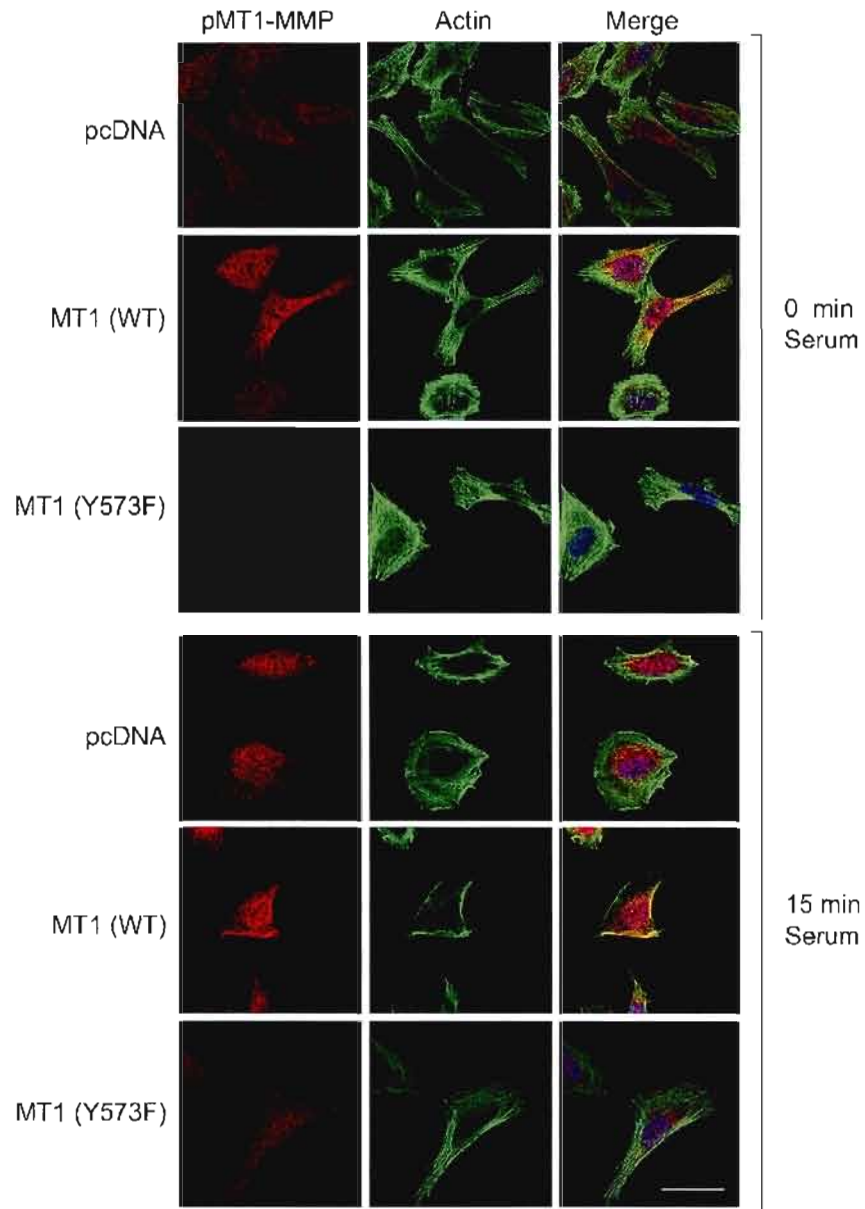


Figure 3. Localization of tyrosine phosphorylated MT1-MMP in NB cells
 Nyalendo *et al.*, 2009. *BMC Cancer*, en révision.

4.4 L'inhibition de la phosphorylation de la MT1-MMP bloque la progression tumorale chez la souris.

Résumé

Nous avons récemment démontré que la phosphorylation de la métalloprotéase matricielle de type membranaire 1 (MT1-MMP) sur son résidu tyrosine cytoplasmique 573 joue un rôle important dans plusieurs processus responsables de la progression tumorale. Dans cette étude, nous montrons que le peptide ACM-14 non phosphorylable et perméable aux cellules, correspondant au domaine muté (Y573F) du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP couplé au facteur de transcription antennapedia de la *Drosophila*, inhibe la phosphorylation de l'enzyme sur son résidu tyrosine intracellulaire et réduit de façon marquée la prolifération des cellules tumorales dans des matrices de collagènes en 3D. L'effet antiprolifératif de l'ACM-14 était corrélé avec le clivage de la procaspase-3 et de PARP et était complètement renversé par z-VAD-fmk, un inhibiteur général des caspases, suggérant l'activation du programme proapoptotique par le peptide. En effet, l'administration sous-cutanée de l'ACM-14 retardait de façon marquée la progression tumorale chez la souris et augmentait la survie, ces actions antitumorales étant associées à une forte induction de la nécrose tumorale dans les animaux traités. Ensemble, ces résultats suggèrent que l'inhibition de la phosphorylation de la MT1-MMP sur sa tyrosine cytoplasmique représente une nouvelle et attrayante stratégie pour le développement de médicaments contre le cancer.

**ACCEPTATION DES CO-AUTEURS POUR L'UTILISATION
D'UN ARTICLE DANS UNE THÈSE**

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Nous entérinons que Carine Nyalendo

est l'auteur principal de l'article intitulé :

Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase blocks tumor progression in mice. Nyalendo C, Sartelet H, Gingras D, Béliveau R. 2009. Manuscrit en révision dans *Cancer Biology and Therapy*.

et qu'il peut l'utiliser pour sa thèse.

Co-auteur(s)

1) Sartelet, Hervé
Nom, prénom


Signature


15/1/09
Date

2) Gingras, Denis
Nom, prénom


Signature

14/1/09
Date

3) Béliveau, Richard
Nom, prénom


Signature

21/01/09
Date

CONTRIBUTION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DES CO-AUTEURS

Note : Seul l'auteur principal peut utiliser l'article mentionné ci-dessous pour sa thèse. Aucune autre personne, incluant les autres co-premiers auteurs le cas échéant, ne pourra utiliser l'article dans une thèse ou un mémoire.

Description du rôle de chacun des auteurs en commençant par l'auteur principal : tâches et responsabilité spécifiques, nature de la contribution à l'article (rédaction, expérimentation, figures, recherche bibliographique, etc.)

J'ai personnellement effectué la recherche bibliographique, la planification expérimentale, la réalisation des expériences et la rédaction du manuscrit. Le Dr Hervé Sartelet, pathologiste au CHU Sainte-Justine, a effectué les coupes histologiques présentées à la figure 4C.

Le Dr Denis Gingras est le superviseur du projet et a étroitement contribué à son élaboration et à la révision du manuscrit.

Le Dr Richard Béliveau est mon directeur de thèse. Il m'a guidé aux niveaux conceptuel et technique dans la réalisation du projet.

ATTESTATION DE L'AUTEUR PRINCIPAL ET DU DIRECTEUR DE RECHERCHE

L'auteur principal de l'article intitulé :

Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase blocks tumor progression in mice.

soumis pour publication ☒, accepté pour publication ☐, ou publié ☐ dans : Cancer Biology and Therapy

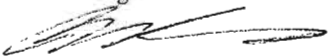
est : **Carine Nyalendo**

Auteur principal Nyalendo, Carine
Nom, Prénom


Signature

21/01/09
Date

Directeur de recherche Béliveau, Richard
Nom, Prénom


Signature

21/01/09
Date

*Manuscrit***4.4 Inhibition of membrane-type 1 matrix metalloproteinase phosphorylation blocks tumor progression in mice.**

Carine Nyalendo¹, Hervé Sartelet², Denis Gingras¹, Richard Béliveau^{1*}

¹*Laboratoire de Médecine Moléculaire, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec H3C 3P8 and ²Département de Pathologie, CHU Sainte-Justine, 3175, Chemin Côte-Sainte-Catherine, Montréal, Québec (Canada) H3T 1C5*

Keywords: MT1-MMP, MMP-14, tyrosine phosphorylation, antenapedia, tumor progression, 3D matrix.

***To whom correspondence should be addressed:**

Phone: (514) 987-3000 x8551

FAX: (514) 987-0246

E-mail: oncomol@nobel.si.uqam.ca

[¶] Supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research to R.B. and D.G.

Running Title: Inhibition of MT1-MMP phosphorylation

Abstract

We recently reported that membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is phosphorylated on its unique cytoplasmic tyrosine residue but the contribution of this event to tumor progression remains unclear. In this work, we show that the non phosphorylable cell-permeable peptide ACM-14, consisting of the mutated (Y573F) cytoplasmic domain of MT1-MMP coupled to antennapedia, inhibits tyrosine phosphorylation of the enzyme and markedly reduces tumor cell proliferation within 3D type I collagen matrices. Interestingly, administration of ACM-14 to mice markedly delays tumor progression and increases survival, these antitumor actions being associated with the induction of extensive tumor necrosis. Overall, these findings suggest that inhibition of MT1-MMP tyrosine phosphorylation may represent an attractive strategy for the development of novel anticancer drugs.

Introduction

Membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP; MMP-14) plays essential roles in tumor cell migration and invasion by acting as a potent matrix-degrading protease that proteolyzes a broad spectrum of cell surface-associated and ECM proteins (reviewed in (Itoh et Seiki, 2006)). MT1-MMP is overexpressed in many types of tumors (Nakada *et al.*, 1999 ; Zhai *et al.*, 2005) and pericellular proteolysis of the dense cross-linked meshwork of type I collagen fibrils mediated by the enzyme confers neoplastic cells with tissue-invasive activity (Sabeh *et al.*, 2004) and sustains tumor cell growth in otherwise growth-restrictive three-dimensional (3-D) matrices (Hotary *et al.*, 2003)

In addition to its important matrix-degrading activity, MT1-MMP contains a short cytoplasmic sequence whose function seems important for tumor cell invasion. Cells expressing cytoplasmic domain-deleted MT1-MMP mutants retain the ability to proteolyse the ECM but have a markedly reduced migratory potential (Gingras *et al.*, 2001 ; Labrecque *et al.*, 2004 ; Langlois, Gingras et Beliveau, 2004 ; Lehti *et al.*, 2000 ; Uekita *et al.*, 2001), suggesting a role of this domain in linking extracellular proteolysis to intracellular signaling events involved in cell locomotion. Accordingly, the cytoplasmic sequence of MT1-MMP actively participates to the internalization of the enzyme (Uekita *et al.*, 2001), to the activation of the ERK signaling pathway (D'Alessio *et al.*, 2008 ; Gingras *et al.*, 2001) as well as to its interaction with tyrosine phosphorylated caveolin-1 (Labrecque *et al.*, 2004), and these events may all contribute to efficient cell locomotion triggered by the enzyme. We also showed that MT1-MMP is phosphorylated on its unique cytoplasmic tyrosine residue and that this event may also participate to tumor and endothelial cell migration (Gingras *et al.*, 2008 ; Nyalendo *et al.*, 2007). More recently, we reported that overexpression of a dominant-negative, non phosphorylable mutant of MT1-MMP (Y573F) in the highly invasive HT-1080 fibrosarcoma cell line markedly reduces the proliferation of these cells within 3-D collagen matrices and completely inhibits their growth in mice, suggesting that the inhibition of MT1-MMP tyrosine phosphorylation may represent an unexpected strategy to block tumor progression (Nyalendo *et al.*, 2008).

To investigate this possibility, we designed a cell-permeable peptide consisting of a mutated non phosphorylable version of the cytoplasmic domain of MT1-MMP coupled to the cell penetrating third helix of the homeodomain of the *Drosophila* transcription factor antennapedia.

Herein, we report that this peptide, termed ACM-14 (Antennapedia-coupled Cytoplasmic MMP-14), inhibits Src-mediated tyrosine phosphorylation of MT1-MMP, leading to the inhibition of tumor cell proliferation within 3-D collagen matrix in a caspase-dependent manner. In addition, we show that subcutaneous administration of ACM-14 delays tumor progression in mice.

Materials and methods

Peptides and cell lines

Biotinylated peptides consisting of the homeodomain of antennapedia transcription factor (RQIKIWFQNRRMKWKK) coupled to sequences corresponding to the non phosphorylable cytoplasmic domain of MT1-MMP (RRHGTPRLLFCQRSLLDKV) (ACM-14 peptide) or its scrambled version (TLRQRRCLPHFDSGLRKVRL) (scACM-14) were synthesized by 21st Century Biochemicals (Marlboro, MA, USA).

All cell lines (HT-1080, SK-Mel-28, DAOY, U-87 MG, PC-3, A-549, MDA-MB-231 and MG-63) were cultured at 37°C in a humidified atmosphere composed of 95% air and 5% CO₂ and grown as recommended by the American Type Culture Collection.

In vitro phosphorylation of MT1-MMP

A GST fusion protein containing the cytoplasmic domain of MT1-MMP was incubated for 2 h at 30°C with recombinant His6-Src (Upstate-Millipore) in 100 µl of phosphorylation buffer (20 mM HEPES pH 7.5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP) containing equivalent molar concentrations (0.35 nmole) of either the ACM-14 or scACM-14 peptides. The reaction was stopped by boiling for 5 min in Laemmli buffer and samples (20 µl) were subjected to immunoblotting using the monoclonal pY99 antibody (Santa Cruz Biotechnology) or polyclonal antibodies specific to the tyrosine phosphorylated form of MT1-MMP (Nyalendo et al., 2007).

2D/3D cell culture

Type I collagen was extracted from rat tail and resuspended at 2.7 mg/ml in acetic acid. For 2D culture, cells were seeded on plates coated with 100 µg/ml type I collagen. For 3D culture, cells were mixed with 10X EMEM, 0.17N NaOH and 2.7 mg/ml type I collagen. The mixture was allowed to gel for 45 min at 37°C and culture media (EMEM) containing 10% FBS was added atop. For growth inhibition, 1 to 10 µM of ACM-14 or scACM-14 were added to culture media (for 2-D growth), or incorporated into the collagen gels (for 3-D growth). Collagen gels were dissolved using 2 mg/ml bacterial collagenase (Sigma) and viable cells were counted by trypan blue exclusion using a hemacytometer. For FACS analysis, cells extracted from collagen gels were processed as described (Nyalendo et al., 2008).

Fluorescence and Confocal Microscopy

The procedure has been described previously (Nyalendo et al., 2008), using antibodies against phosphoMT1-MMP (Nyalendo et al., 2007) or MT1-MMP (MAB3328, Chemicon International). Biotinylated peptides were stained with FITC-conjugated streptavidin. Fluorescence was visualized and photographed using a Zeiss LSM 510 Meta confocal microscope.

Immunoprecipitation and Western Blotting

The procedures have been described previously (Labrecque et al., 2004). Briefly, equal amounts of proteins were incubated overnight at 4°C in the presence of 1 µg/ml of MT1-MMP MAB3328 monoclonal antibody and the immune complexes were collected with Protein G-coupled Sepharose beads. Bound material was solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 5 min, separated by SDS-PAGE and blotted with HRP-conjugated

streptavidin (for detection of ACM-14 and scACM-14) or with antibodies against tyrosine phosphorylated MT1-MMP (Nyalendo et al., 2007).

In vivo tumor growth

6 week-old female athymic nude mice (CrI: CD-1® -Foxn/nu) were purchased from Charles River Laboratories (Wilmington, MA, USA). Experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council of Animal Care. Mice were anesthetized with O₂/isoflurane inhalation and 5x10⁶ HT-1080 fibrosarcoma viable cells (in 100 µl of 1% methylcellulose in serum-free EMEM) were implanted subcutaneously into the flank of mice. Once tumors reached 100 mm³, animals were randomly separated into three groups: vehicle (0.85% NaCl) n=5, scACM-14 n=5 and ACM-14 n=6; and were given daily subcutaneous administrations of the peptides (ACM-14 or scACM-14, 10 mg/kg) or vehicle, distant of tumor site (in the head, between the ears). Tumor size was measured every 2 days using a digital caliper and calculated using the formula $\pi/6 \times \text{length} \times \text{width}^2$. For kinetic studies, mice were sacrificed after 26 days. For survival studies, animals were sacrificed once tumors reached either 700 mm³ or 50 days post-implantation. Kaplan-Meier survival curves were performed using the Graphpad Prism program. Histological analysis was performed as previously described (Nyalendo et al., 2008).

Statistical analysis

All statistical analyses were performed by one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post-tests. Analyses were performed using GraphPad Prism program. P< 0.05 was considered statistically significant.

Results and discussion

The ACM-14 peptide inhibits tyrosine phosphorylation of MT1-MMP

The ACM-14 peptide consists of the mutated (Y573F) cytoplasmic domain of MT1-MMP fused to antennapedia (Fig. 1A). This peptide, as well as its scrambled version (scACM-14), rapidly entered in tumor cells, being detectable as early as 15 minutes after their addition to the cell media (supplementary Fig. S1). *In vitro* phosphorylation assays using a GST fusion protein containing the MT1-MMP cytoplasmic sequence (GST-MT) showed that ACM-14 completely inhibits the Src-mediated tyrosine phosphorylation of this domain, whereas the scrambled control peptide had no effect (Fig. 1B). Interestingly, we observed that in tumor cells, ACM-14, but not its scrambled counterpart, co-immunoprecipitated and co-localized with MT1-MMP, this association occurring predominantly in the perinuclear compartment (Fig. 1C and 1D, upper panels). The interaction between MT1-MMP and ACM-14 was correlated with a marked decrease in the levels of tyrosine phosphorylated MT1-MMP (Fig. 1C and 1D, lower panels). The peptides had however no inhibitory effect on either the cell surface expression of MT1-MMP or catalytic activity of the enzyme towards proMMP-2 (supplementary Fig. S2), suggesting that the interaction of the peptide with the enzyme does not alter its subcellular localization. Overall, these results indicate that ACM-14 is a cell-permeable peptide that inhibits MT1-MMP tyrosine phosphorylation, possibly by physically interacting with the enzyme. Although the mechanisms involved in this interaction remain to be established, it is noteworthy that the PRXXLYC⁵⁷⁴XRSXXXXV motif located in the cytoplasmic tail of MT1-MMP has been suggested to be involved in the dimerization of the enzyme and this sequence may thus interact with the peptide (Rozanov *et al.*, 2001). Such a dimerization of ACM-14 with the cytoplasmic tail of MT1-MMP may result in the inaccessibility of the cytoplasmic tyrosine 573 for phosphorylation reactions. Interestingly, since this dimerization motif is also present in other transmembrane MMPs involved in tumor cell invasion within 3-D collagen matrix, such as MT2- and MT3-MMP (Hotary *et al.*, 2000) and that these enzymes also possess a conserved tyrosine residue adjacent to the cysteine residue (Gingras et Beliveau,

2009), these MT-MMPs could also be tyrosine phosphorylated in their cytoplasmic tail and may thus be sensitive to ACM-14 inhibition. Further studies are currently underway in our laboratory in order to investigate this possibility.

ACM-14 reduces tumor cell proliferation within 3-D matrices through a caspase-dependent mechanism

In addition to the crucial role of MT1-MMP-dependent proteolysis for tumor cell proliferation in 3D environments (Hotary *et al.*, 2003), our recent results suggest that the tyrosine phosphorylation of the enzyme within its intracellular domain may also participate to this process (Nyalendo *et al.*, 2008). As shown in Fig. 2A, while ACM-14 did not affect tumor cell proliferation in 2-D conditions, it significantly reduced the proliferation of several tumor cell lines within 3-D collagen gels. Indeed, ACM-14 reduced the proliferation of glioblastoma (40%), medulloblastoma (35%), prostate and breast adenocarcinoma (83% and 29% respectively), osteosarcoma (68%) and fibrosarcoma (50%) cells, while the scrambled version of the peptide had no significant inhibitory effect. ACM-14 showed however no inhibitory effect on the proliferation of lung carcinoma or melanoma cells (Fig. 2A). However, low levels of MT1-MMP were observed in these two cell lines and their proliferation was largely independent of the enzyme's activity, as reflected by their insensitivity to TIMP-2 and GM6001 (results not shown).

Interestingly, the inhibitory effect of ACM-14 on tumor cell proliferation was correlated with an increase of apoptosis. Approximately 40% of untreated HT-1080 fibrosarcoma cells grown within the collagen matrix underwent apoptosis, possibly reflecting cell death induced by the growth-restrictive 3-D environment (Fig. 3A). ACM-14 (but not its control peptide scACM-14) induced a small but significant increase (15%) in the number of apoptotic cells that was correlated with the cleavage of caspase-3 and PARP (Fig. 3B), two classical markers of apoptosis (Chowdhury, Tharakan et Bhat, 2008). We also observed that ACM-14 inhibited ERK1/2 phosphorylation (Fig. 3B), an effect that may also contribute to

the reduction of cell survival induced by the peptide. Interestingly, the pan specific caspase inhibitor z-VAD-fmk completely reversed ACM-14-induced apoptosis of tumor cells (Fig. 3C) as well as the effect of the peptide on tumor cell proliferation (Fig. 3D), further implying caspase activation as an important mechanism involved in the inhibitory action of the peptide.

ACM-14 increases the survival of mice bearing fibrosarcoma xenografts

In order to examine the impact of ACM-14 on tumor growth, HT-1080 fibrosarcoma cells were implanted subcutaneously in athymic mice. After 12 days, animals were given daily subcutaneous injections of the peptides (ACM-14 or scACM-14, 10 mg/kg each) or vehicle and tumor size was monitored every two days. As shown in Fig. 4A, administration of ACM-14 strongly reduced (70%) tumor growth 26 days post-implantation. The median survival of mice that received ACM-14 was increased by 10 days, with one tumor that completely regressed following treatment with the peptide (Fig. 4B). The antitumor effect of the peptide was well illustrated by low magnification histological examination of paraffin sections which showed that ACM-14 induced extensive necrosis of the tumor tissue, in agreement with its cytotoxic effects observed *in vitro* (Fig. 4C).

Owing to its ECM-degrading activity and important role in tumor progression, MT1-MMP represents an attractive drug target for anticancer therapies. However, broad-spectrum inhibitors of MMP activity described to date have been largely unsuccessful in clinical trials and, in some patients, also induced musculoskeletal side effects (Coussens, Fingleton et Matrisian, 2002 ; Overall et Kleinfeld, 2006). Although the exact mechanisms underlying these effects remain incompletely understood, they may involve an inhibition of MT1-MMP catalytic activity since mice lacking this enzyme present severe skeletal effects (Coussens, Fingleton et Matrisian, 2002 ; Overall et Kleinfeld, 2006). In this context, the identification of molecules that impair tumor cell proliferation *in vitro* and significantly delays tumor progression in mice by interfering with the tyrosine phosphorylation of MT1-MMP, such as

the ACM-14 peptide described in this study, may represent a novel and promising approach to inhibit this important enzyme. Further studies aimed at the molecular characterization of the pathways involved in the tyrosine phosphorylation of MT1-MMP as well as their participation to tumor progression could thus provide interesting new targets for the development of anticancer therapeutics.

Acknowledgements

We would like to thank Yannève Rolland for helpful advises and technical assistance during animal manipulations.

References

Voir page 180.

Legends to figures

Figure 1: Inhibition of MT1-MMP tyrosine phosphorylation by ACM-14.

(A) Peptides used in this study. ACM-14: Antennapedia-coupled Cytoplasmic MMP-14; scACM-14: scrambled ACM-14. Biot: Biotin. Ahx: amino hexanoic acid. (B) *In vitro* phosphorylation of MT1-MMP cytoplasmic domain by recombinant Src. The cytoplasmic domain of MT1-MMP fused to Glutathione-S-Transferase (GST-MT) was incubated with Src in the presence of either ACM-14 or scACM-14. Monoclonal antibody pY99 was used to identify phosphotyrosine (pTyr), while pMT1-MMP polyclonal antibodies recognized phosphorylated MT1-MMP. (C) HT-1080 cells were grown within 3-D collagen matrices containing 1 μ M of either ACM-14 or scACM-14 during 5 days. MT1-MMP was immunoprecipitated (IP) from cell lysates and MT1-MMP-associated peptides were detected using HRP-conjugated streptavidin, while MT1-MMP (pMT1-MMP) was immunodetected with polyclonal antibodies against phosphorylated MT1-MMP (D). HT-1080 cells were seeded on type I collagen-coated slips and incubated with ACM-14 or scACM-14 peptides (1 μ M) during 1 h. Confocal images were obtained by staining the peptides with streptavidin-FITC followed by staining of MT1-MMP and phosphorylated MT1-MMP using primary antibodies specific to these proteins followed by rhodamine-conjugated secondary antibodies. The scale bar represents 50 μ m.

Figure 2: Reduction of cell proliferation within 3-D collagen matrix by ACM-14.

(A) Cells were allowed to grow atop of collagen film (2D) or within collagen gel (3D) during 5 days in the presence of scACM-14 or ACM-14 peptides, as indicated. (B) Total cellular content of MT1-MMP was assessed by Western Blot.

Figure 3: ACM-14 induces apoptosis of tumor cells.

HT-1080 fibrosarcoma cells were grown for 5 days within 3-D collagen matrices with or without 1 μ M of the peptides (ACM-14 or scACM-14) (A), or with ACM-14 in the absence or in the presence of z-VAD-fmk (C). Cells were extracted from collagen gels and double stained with Annexin V and propidium iodine for apoptosis analysis by flow cytometry. (B)

Total cellular content of some apoptosis markers was assessed by western blot. (D) Cells were allowed to grow within 3-D collagen matrices and proliferation was determined by counting.

Figure 4: Inhibition of tumor growth by the ACM-14.

5×10^6 HT-1080 fibrosarcoma cells were implanted subcutaneously in athymic nude mice and after 12 days, the peptides (ACM-14 or its control scACM-14) were subcutaneously administrated daily (10 mg/kg). (A) Kinetic of tumor growth. $n=5$ for vehicle, $n=5$ for scACM-14, $n=6$ for ACM-14. $***P<0.001$. (B) Kaplan-Meier survival curves. (C) Histological analysis of paraffin-embedded xenografts. Dotted lines show the tumor zones. Necrotic tumor cells show a pink staining, while viable tumor cells show a purple staining. M, mouse tissue; T, tumor; *, small necrotic zones. Black scale bars represent 1000 μm .

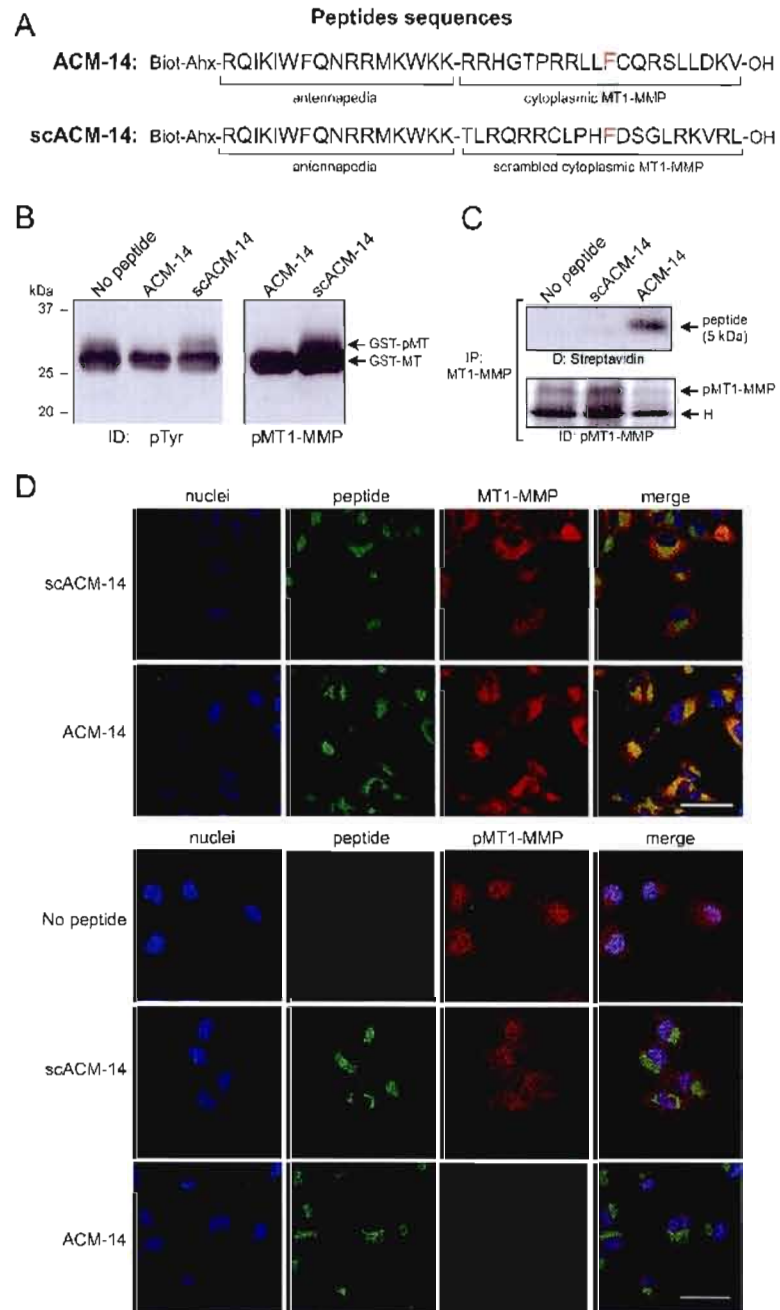


Figure 1. Inhibition of MT1-MMP tyrosine phosphorylation by ACM-14.

Nyalendo *et al.*, 2009. *Cancer Biology and Therapy*, en révision.

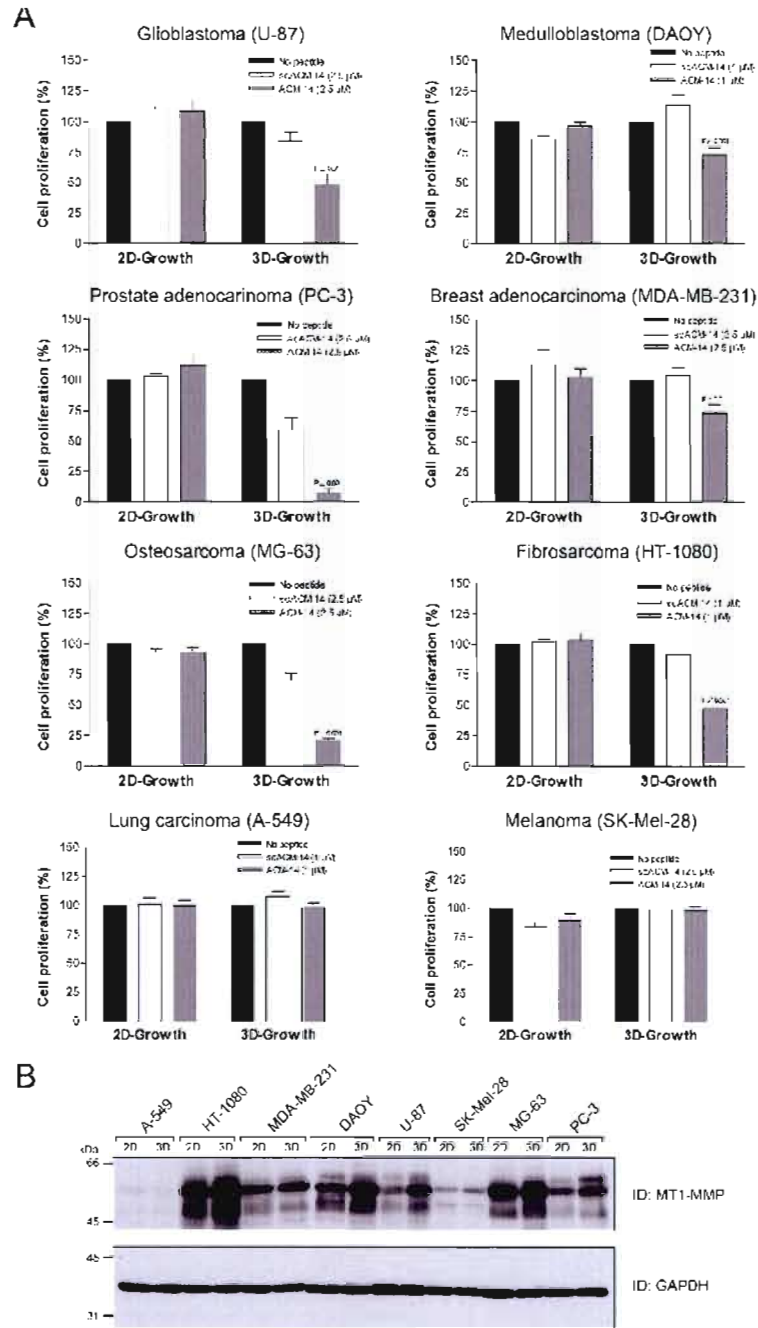


Figure 2. Reduction of tumor cell proliferation within 3-D collagen matrix by ACM-14. Nyalendo *et al.*, 2009. *Cancer Biology and Therapy*, en révision.

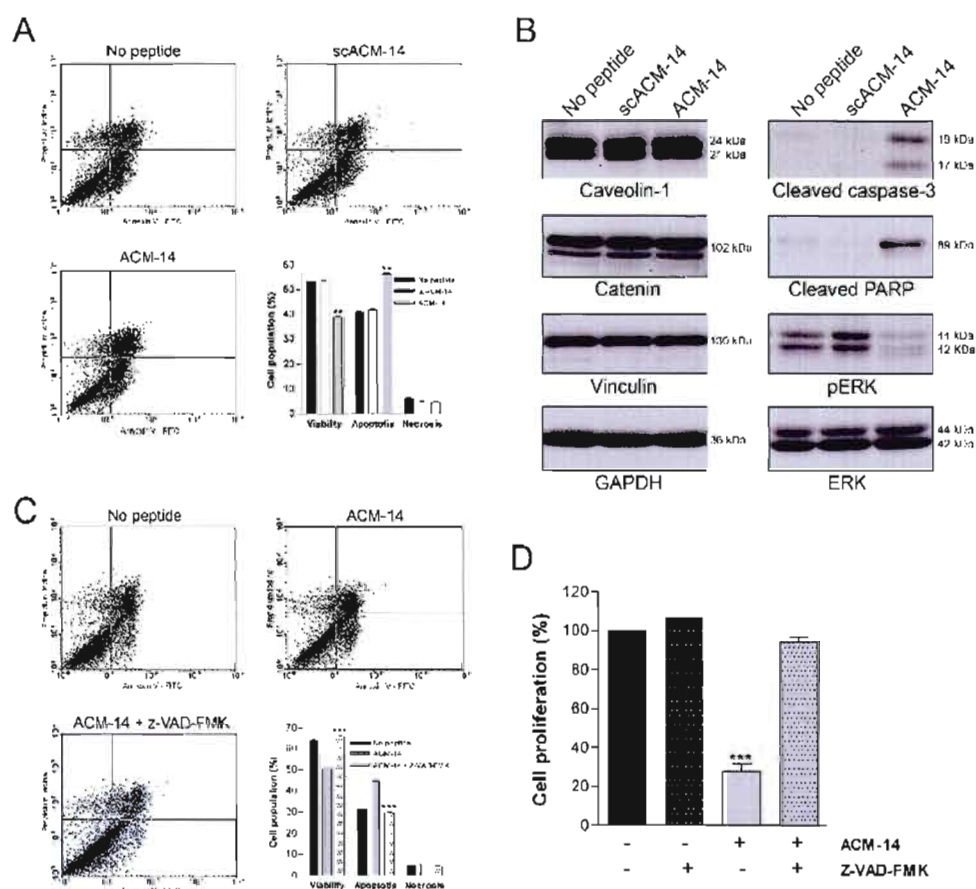


Figure 3. ACM-14 induces apoptosis of tumor cells.

Nyalendo *et al.*, 2009. *Cancer Biology and Therapy*, en révision.

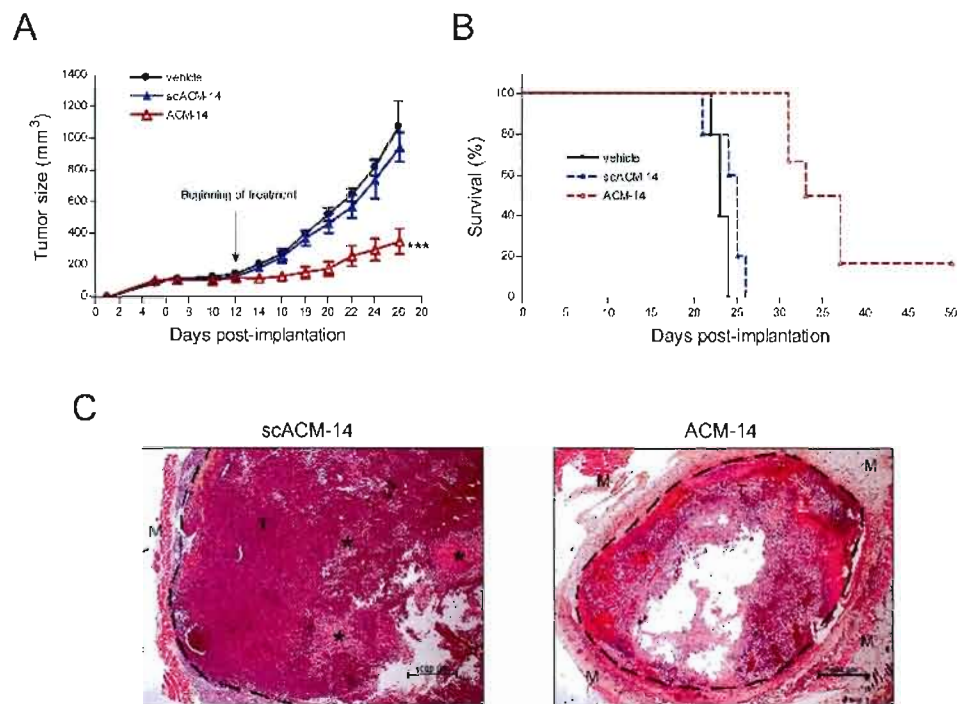
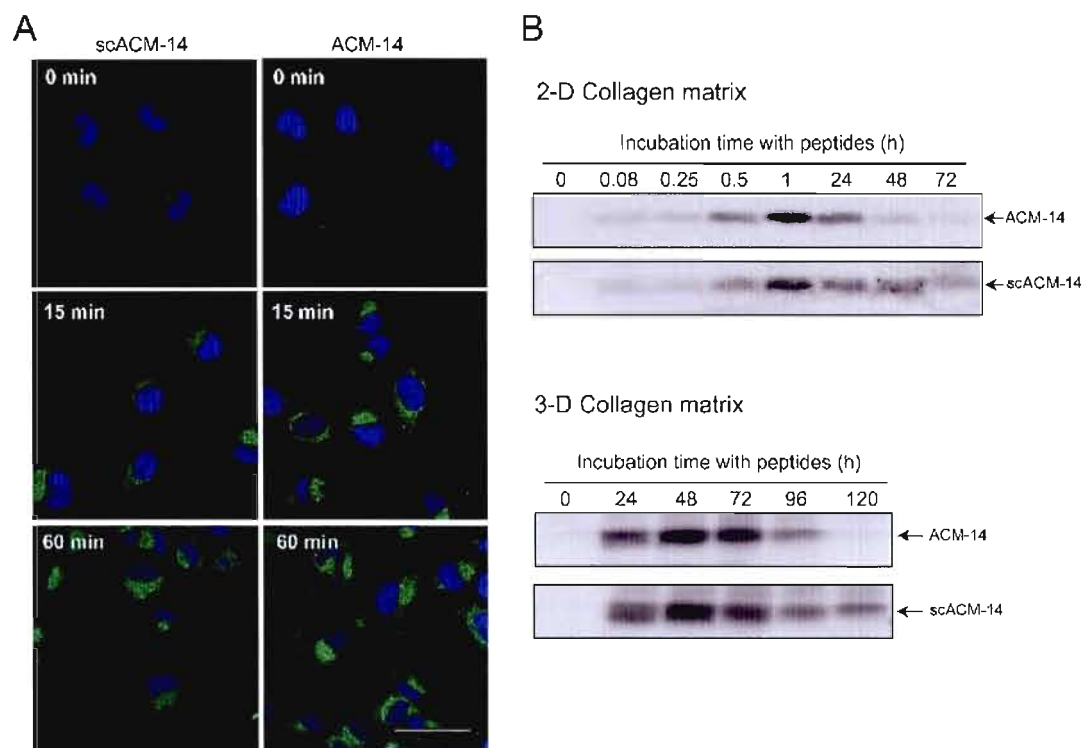


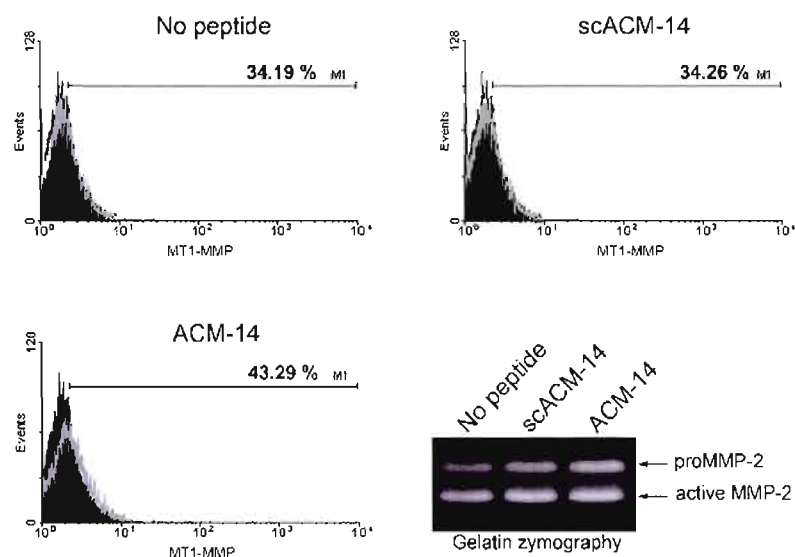
Figure 4. Inhibition of tumor growth by the ACM-14.

Nyalendo *et al.*, 2009. *Cancer Biology and Therapy*, en révision.

Supplementary figures



Supplementary Figure S1: Cellular uptake of ACM-14 and scACM-14 peptides. (A) HT-1080 cells were seeded on type I collagen-coated slides, and incubated with ACM-14 and scACM-14 peptides (1 μ M) during 15 or 60 minutes. Confocal images of fluorescence were obtained following intracellular staining of peptides using FITC-conjugated streptavidin. The white scale bar represents 50 μ m. (B) HT-1080 cells were incubated with ACM-14 and scACM-14 (1 μ M) during the indicated periods of time. For 2-D growth, cells were seeded atop of a type I collagen film, and for 3-D growth, cells were embedded within type I collagen gels. Cellular content of peptides was assessed by Western Blotting, using HRP-conjugated streptavidin.



Supplementary Figure S2: HT-1080 cells were incubated with ACM-14 and scACM-14 ($1\mu\text{M}$) and were allowed to grow within 3D collagen matrix for 24 hours. MT1-MMP cell surface expression was monitored by flow cytometry. Black areas represent the control isotype (mouse IgG) while grey lines represent MT1-MMP. Conditioned media were analyzed for MT1-MMP-dependent activation of MMP-2 by gelatin zymography.

Supplementary methods

Uptake of peptides

ACM-14 and scACM-14 uptake by tumor cells was determined by fluorescence or western blot. For fluorescence, HT-1080 fibrosarcoma cells were seeded on type I collagen-coated cover-slides and incubated with peptides. Intracellular peptides were detected using FITC-conjugated streptavidin (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). For western blotting, cells were seeded atop of a type I collagen film (2-D) or embedded within type I collagen gels (3-D) and incubated with peptides, followed by protein extraction as described previously¹⁰. Briefly, equal amounts of proteins were solubilized in Laemmli sample buffer, boiled for 5 min, separated by SDS-PAGE containing 15% acrylamide and blotted with HRP-conjugated streptavidin (Chemicon – Millipore, Billerica, MA, USA).

Flow Cytometry Analysis of MT1-MMP

HT-1080 fibrosarcoma cells embedded within type I collagen gels (3-D) for 5 days were extracted from collagen gels using bacterial collagenase and washed twice with binding buffer (BB) containing 0.1% BSA in PBS. 10^6 cells were incubated for 1 h at 4°C with 1 ml of 1 µg/ml MT1-MMP (MAB3328) antibody or a control mouse IgG (Sigma) in BB, washed twice with BB and incubated with anti-mouse FITC-conjugated antibody for 30 min at 4°C in the dark. After two washes, cells were resuspended in 1 ml BB and analyzed using the FACS Calibur (BD Biosciences).

Gelatin zymography

10 µl of conditioned media from cells grown within collagen gels were resuspended in non-reducing sample buffer and subjected to SDS-PAGE, using polyacrylamide gels

containing 1 mg/ml gelatin. Gels were then washed twice for 30 min in 2.5% Triton X-100 and rinsed with nanopure water. Gels were incubated at 37°C in zymography buffer (50 mM Tris pH 7.6, 200 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.02% Brij 35) for 18 h and digested areas were visualized by coloration of the gels with Coomassie Blue.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Durant la progression tumorale, les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement tumoral augmentent leur expression des MMPs, leur permettant ainsi de survivre dans des conditions extrêmes qui d'ordinaire, seraient limitantes voire létales pour une cellule normale. En effet, l'activité protéolytique générée par les MMPs permet aux cellules tumorales d'envahir les tissus et de se propager dans l'organisme. La découverte des MMPs comme des acteurs clés dans les mécanismes impliqués dans la progression tumorale a suscité un engouement dans la communauté scientifique et les industries pharmaceutiques, afin de développer des inhibiteurs de MMPs pour le traitement des cancers. Toutefois, les résultats décevants des nombreux essais cliniques soulèvent la nécessité de se pencher davantage sur les mécanismes d'action des MMPs (Coussens, Fingleton et Matrisian, 2002).

La MT1-MMP, dont le rôle central dans la progression tumorale n'est plus à prouver, est unique due à sa localisation à la surface cellulaire. Le premier avantage lié à la localisation de la MT1-MMP est la protéolyse péricellulaire, qui est très importante dans la migration et l'invasion tumorales. En effet, l'activité protéolytique péricellulaire de la MT1-MMP est essentielle car 1) elle provoque la dégradation de nombreux composants de la MEC et de molécules impliqués dans l'adhésion entre cellules et des cellules avec la MEC, 2) elle active des facteurs de croissance et des cytokines, 3) elle active plusieurs récepteurs de surface impliqués dans la transduction de signaux et 4) elle amplifie le processus de dégradation de la MEC en activant les proMMP (Barbolina et Stack, 2008). Un deuxième avantage de la localisation transmembranaire de la MT1-MMP est la présence d'une

séquence intracellulaire dont les études récentes témoignent de son importance dans les fonctions cellulaires orchestrées par l'enzyme, en particulier dans la migration cellulaire. Par exemple, la délétion du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP entrave le processus de migration des cellules tumorales (Gingras *et al.*, 2001 ; Lehti *et al.*, 2000 ; Rozanov *et al.*, 2001 ; Uekita *et al.*, 2001) et endothéliales (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004). Plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer cet effet inhibiteur sur la migration cellulaire. En effet, il pourrait être non seulement causé par un défaut d'internalisation de l'enzyme (Uekita *et al.*, 2001), une réduction de l'activation de la cascade de signalisation induite par la kinase ERK (Gingras *et al.*, 2001), mais aussi par une inhibition de l'interaction de l'enzyme avec la cavéoline-1 phosphorylée (Labrecque *et al.*, 2004).

Dans la présente thèse, nous nous sommes attardés à étudier davantage les mécanismes pouvant expliquer l'importance majeure de la portion intracellulaire de la MT1-MMP dans la migration cellulaire. Nos résultats suggèrent que l'implication du domaine cytoplasmique de la MT1-MMP dans la migration cellulaire pourrait s'expliquer par la phosphorylation de l'unique résidu tyrosine situé dans son domaine intracellulaire. Dans un premier temps, nous avons observé qu'en immunoprécipitant la MT1-MMP, des protéines phosphorylées sur des résidus tyrosines ayant une masse moléculaire et des points isoélectriques très similaires à ceux de la MT1-MMP étaient également immunoprécipitées, suggérant ainsi que ces protéines soient des formes phosphorylées de la MT1-MMP. Cette hypothèse s'est ensuite confirmée avec l'utilisation d'un mutant de la MT1-MMP où l'unique tyrosine cytoplasmique a été remplacée par une phénylalanine. Nous avons observé que le mutant Y573F empêchait la phosphorylation de la MT1-MMP, et que des anticorps phosphospécifiques dirigés spécifiquement contre les formes phosphorylées de l'enzyme ne reconnaissaient pas cette forme mutante de la MT1-MMP. Par conséquent, dans les conditions expérimentales utilisées dans ces travaux, ces observations indiquent clairement que la MT1-MMP est phosphorylée sur son unique résidu tyrosine cytoplasmique.

Nous avons également remarqué que la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine intracellulaire requérait l'expression concomitante de la kinase Src. De plus,

cette phosphorylation était complètement abolie par l'expression d'une forme de la kinase Src catalytiquement inactive, ce qui indique que la kinase Src et/ou une autre kinase activée par cette dernière est nécessaire à la phosphorylation de la tyrosine intracellulaire de la MT1-MMP. Dans ces conditions où la kinase Src était surexprimée, cette dernière induisait également la phosphorylation de la cavéoline-1 et son interaction subséquente avec la MT1-MMP, tel que présenté dans le premier manuscrit (Section 4.1) et dans des études antérieures réalisées dans notre laboratoire (Labrecque *et al.*, 2004). Nos résultats indiquent cependant que l'interaction de la MT1-MMP avec la cavéoline-1 phosphorylée n'était ni nécessaire pour, ni une conséquence de la phosphorylation de l'enzyme. Toutefois, nous avons observé qu'une réduction des niveaux de cavéoline-1 augmentait l'expression et les niveaux de phosphorylation de la MT1-MMP, suggérant ainsi que la cavéoline-1 participerait au renouvellement de l'enzyme.

Fait intéressant, la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine n'était pas restreinte aux cellules surexprimant la kinase Src, mais pouvait également être détectée dans des cellules endothéliales et tumorales non transfectées et stimulées avec la sphingosine-1-phosphate (S1P), un facteur chimioattracteur. Tel que démontré dans la présente thèse et dans une autre étude réalisée dans notre laboratoire (Gingras *et al.*, 2008), la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine induite par la S1P était corrélée avec une relocalisation de l'enzyme à la périphérie cellulaire, soulevant la possibilité intéressante que cette phosphorylation puisse participer à la migration cellulaire induite par ce lipide.

Cette relocalisation de la MT1-MMP phosphorylée en périphérie coïncidait également, de façon inattendue, avec sa relocalisation dans le noyau. Une étude récente a mis en évidence l'existence d'une sous-population de la MT1-MMP dans le noyau et sa corrélation avec l'agressivité des carcinomes hépatocellulaires (Ip, Cheung et Fan, 2007). Bien que les résultats rapportés par Ip *et al.* (2007) ne soient que descriptifs et demandent à être approfondis, nos résultats suggèrent que la phosphorylation de la MT1-MMP pourrait être un mécanisme impliqué dans l'acheminement de l'enzyme dans le compartiment nucléaire. La localisation atypique nucléaire de protéines traditionnellement situées à la

membrane plasmique est une observation de plus en plus fréquente. C'est le cas par exemple de l'EGFR et du VEGFR-2, qui exerceraient la fonction de facteurs de transcription dans le noyau (Lo, Hsu et Hung, 2006).

Nous avons également observé que la phosphorylation de la MT1-MMP induite par la SIP induisait une colocalisation partielle de l'enzyme avec la cavéoline-1 phosphorylée, une phosphoprotéine importante pour la motilité des cellules endothéliales (Beardsley *et al.*, 2005).

L'importance de la phosphorylation de la MT1-MMP dans la migration cellulaire induite par la SIP est également suggérée par les observations suivantes. Premièrement, le mutant non phosphorylable de la MT1-MMP était en mesure d'inhiber la migration des cellules qui expriment de façon endogène la MT1-MMP, soit les cellules de fibrosarcome HT-1080 et les cellules endothéliales HUVEC. Deuxièmement, le mutant non phosphorylable était incapable de stimuler la migration des cellules endothéliales BAEC, une lignée cellulaire qui n'exprime que de très petites quantités de l'enzyme, alors que la forme sauvage de la MT1-MMP induisait la migration de ces cellules. Cette phosphorylation de la MT1-MMP sur sa tyrosine intracellulaire dépendante de la SIP pourrait s'expliquer, d'une part, par la coopération préférentielle de l'enzyme avec ce lipide, afin d'induire la migration et la différenciation morphogénique des cellules endothéliales (Langlois, Gingras et Beliveau, 2004), et, d'autre part, par l'absence d'effet promigratoire de la SIP dans les cellules qui n'expriment pas la MT1-MMP (Pilorget *et al.*, 2005).

La phosphorylation du résidu tyrosine 573 dans le domaine intracellulaire de la MT1-MMP était inattendue car cette région ne contient pas 1) des motifs connus de reconnaissance par les tyrosines kinases (R/K/Q)X₂₋₄(D/E)X₂₋₃pY (Wu, Ma et Lam, 1994), 2) des motifs de liaison pour les domaines d'homologie de Src SH2 ou SH3 (pYXX(I/L) ou PXX, respectivement) qui pourraient faciliter le recrutement des tyrosines kinases. Néanmoins, lors d'un essai d'activité kinasique *in vitro*, nous avons observé que la kinase Src recombinante

était en mesure de phosphoryler le résidu tyrosine présent dans la portion cytoplasmique de la MT1-MMP.

En dépit de l'absence de ces séquences consensus connues pour leur implication dans la transduction de signal, des résultats précédents ont toutefois suggéré que la séquence précédant le résidu tyrosine 573 joue un rôle important dans les fonctions de la MT1-MMP. Durant la migration cellulaire, la MT1-MMP est localisée au front de migration où elle est continuellement renouvelée grâce à une internalisation dynamique, un processus nécessaire à la bonne réalisation de la migration et de l'invasion cellulaires. Il a été suggéré que la séquence LLY⁵⁷³ est essentielle pour le renouvellement de l'enzyme au front de migration via son implication dans l'interaction de la MT1-MMP avec la sous unité $\mu 2$ de la protéine adaptatrice AP-2 (Uekita *et al.*, 2001), suggérant que la phosphorylation réversible de ce résidu tyrosine jouerait un rôle dans cette interaction.

Une interaction similaire entre la sous unité $\mu 2$ de l'AP-2 et le récepteur CTL-4 à la surface des lymphocytes T a été rapportée (Shiratori *et al.*, 1997). Cette interaction implique la séquence ¹⁶⁵YVKM¹⁶⁸ cytoplasmique du récepteur et est nécessaire à l'internalisation de ce dernier. La phosphorylation du résidu tyrosine situé dans cette séquence abolit l'interaction du récepteur CTL-4 et par conséquent son interaction avec la sous unité $\mu 2$ de l'AP-2, en brisant possiblement la poche hydrophobe nécessaire pour l'interaction (Follows *et al.*, 2001 ; Shiratori *et al.*, 1997). Ces observations et les données que nous avons nous ont mené à émettre l'hypothèse selon laquelle la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine intracellulaire pourrait jouer un rôle régulateur négatif sur son internalisation. Cependant, les résultats obtenus ultérieurement n'ont pas confirmé l'hypothèse d'un rôle régulateur négatif de la phosphorylation de la MT1-MMP (voir la figure 1 à la section 4.2 de la présente thèse). Nous avons observé que l'expression du mutant non phosphorylable de la MT1-MMP dans les cellules HT-1080 1) réduisait les niveaux de phosphorylation de l'enzyme alors que son expression n'était pas modulée, 2) augmentait la présence de l'enzyme à la surface de la cellule. Ces résultats suggèrent par conséquent que la phosphorylation de la MT1-MMP est un mécanisme nécessaire à l'internalisation de l'enzyme. De plus, étant donné que le mutant non phosphorylable de l'enzyme inhibait également la migration cellulaire stimulée par la S1P, nous pourrions supposer que

l'induction de la migration cellulaire dépendant de la MT1-MMP par des chimioattracteurs comme la S1P pourrait impliquer la phosphorylation de l'enzyme, en favorisant son internalisation et son renouvellement au front de migration

Parmi toutes ses fonctions, la MT1-MMP, par son activité collagénolytique est capable de protéolyser les barrières 3D de collagène fibrillaire, permettant ainsi aux cellules tumorales qui l'expriment de proliférer et d'envahir les tissus (Hotary *et al.*, 2000 ; Hotary *et al.*, 2003 ; Sabeh *et al.*, 2004). Les résultats présentés dans nos travaux de recherche confirment ce propos. Fait important, toutefois, nous avons observé que des cellules tumorales exprimant un mutant non phosphorylable de la MT1-MMP avaient des activités invasives et prolifératives très réduites dans des gels 3D de collagène de type I, et ce, malgré une expression de l'enzyme à la surface de la cellule et une activité protéolytique (activation de la proMMP-2 et dégradation du collagène) inaltérées. Ces observations soulèvent l'intéressante possibilité que l'activité protéolytique de la MT1-MMP, bien qu'essentielle pour la dégradation des barrières de collagène, ne serait pas suffisante en soi pour soutenir la prolifération des cellules tumorales dans des environnements 3D et suggèrent que les signaux provenant du domaine intracellulaire de l'enzyme participeraient probablement à ce processus. En fait, durant l'invasion tumorale dans des matrices 3D, la protéolyse péricellulaire induite par la MT1-MMP s'effectue au niveau des fronts de migration, dans des structures spécialisées de la membrane appelées pseudopodes (Friedl et Wolf, 2003). La formation des pseudopodes est possible grâce à l'activation de Rac-1, une GTPase de la famille Rho, par un membre de la famille p130cas (Sanz-Moreno *et al.*, 2008). En interagissant avec la kinase p130Cas (Gingras *et al.*, 2008), la MT1-MMP phosphorylée pourrait vraisemblablement être impliquée dans l'activation de Rac-1 et la formation subséquente de pseudosomes. En conséquence, l'inhibition la phosphorylation de la MT1-MMP par la surexpression d'un mutant non phosphorylable, tel que présenté dans cette thèse, bloquerait ainsi la formation de pseudosomes et l'invasion tumorale. Une autre hypothèse pouvant expliquer l'effet inhibiteur du mutant non phosphorylable sur l'invasion tumorale, sans affecter l'activité protéolytique de la MT1-MMP, impliquerait une stratégie d'invasion de type amiboïde. En effet, des études ont démontré que les cellules de fibrosarcome HT-1080 et les cellules d'adénocarcinomes du sein sont capables d'envahir les tissus selon un

mécanisme de type amiboïde indépendant de l'activité protéolytique et nécessitant l'activation de ROCK, par Rho, une petite protéine G impliquée dans la transduction de signal et la contraction de l'actomyosine (Friedl et Wolf, 2003 ; Symons et Segall, 2009 ; Wolf *et al.*, 2003). Une implication de la phosphorylation de la MT1-MMP dans ces processus pourrait donc être envisagée.

Ainsi, la phosphorylation Src-dépendante de la MT1-MMP sur sa tyrosine cytoplasmique serait un mécanisme de régulation positive de la MT1-MMP, lui permettant d'accomplir ses fonctions dans les processus de migration et d'invasion cellulaire. En effet, nos résultats montrent que la baisse de la phosphorylation de l'enzyme endogène induite par l'expression d'un mutant non phosphorylable de la MT1-MMP était corrélée avec une réduction marquée des propriétés invasives et prolifératives des cellules de fibrosarcome à l'intérieure d'un réseau dense de collagène fibrillaire. Cet effet inhibiteur était indépendant de l'activité protéolytique mais était corrélé avec des altérations importantes du cycle cellulaire des cellules dans un environnement 3D. Nous avons observé que la forme sauvage de la MT1-MMP augmente l'activité des protéines impliquées dans le cycle cellulaire, conduisant à une augmentation de la prolifération cellulaire et une augmentation du contenu en ADN des cellules de fibrosarcome HT-1080. Cependant, l'expression de la forme non phosphorylable de la MT1-MMP diminuait les niveaux de cycline D3 et de la kinase dépendante des cyclines 4 (CDK4), et augmentait considérablement les niveaux du médiateur cytotatique p16^{INK4A}, résultant en un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁ et au renversement de la polyploïdie induite par la forme sauvage. Ceci suggère que l'altération de la phosphorylation de la MT1-MMP contrecarrerait les changements dans le cycle cellulaire normalement induits par l'enzyme, tels que l'augmentation de l'activité de la cycline D3 (Hotary *et al.*, 2003).

Bien que les mécanismes en amont responsables de l'effet inhibiteur du mutant non phosphorylable de la MT1-MMP sur la prolifération des cellules tumorales doivent encore être identifiés, il est tentant de spéculer que la formation de complexes moléculaires contenant la forme phosphorylée de la MT1-MMP et des intermédiaires de signalisation clés, tels que la phosphocavéoline-1 ou la protéine p130Cas (Gingras *et al.*, 2008), participent à la

régulation des points de contrôle du cycle cellulaire et confèrent un avantage de croissance aux cellules tumorales emprisonnées dans des gels 3D de collagène. À cet égard, il est à noter qu'au moins une des protéines actuellement identifiées interagissant avec la MT1-MMP phosphorylée, p130Cas, agit comme un régulateur positif aussi bien de la prolifération que de la survie des cellules épithéliales mammaires normales ou transformées en activant des voies de signalisation menant à la progression du cycle cellulaire (Cabodi *et al.*, 2006). Il est également possible que la migration cellulaire dépendante de la phosphorylation de la MT1-MMP sur sa tyrosine intracellulaire implique les voies de signalisation induites par l'EGFR, car une récente étude réalisée dans notre laboratoire démontre que la MT1-MMP transactive l'EGFR par un mécanisme indépendant de l'activité protéolytique de l'enzyme mais impliquant le domaine cytoplasmique de la MT1-MMP de même que la kinase Src (Langlois *et al.*, 2007).

Une telle interférence du mutant non phosphorylable de la MT1-MMP avec les voies de signalisation menant à la progression du cycle cellulaire pourrait également expliquer l'effet inhibiteur sur la croissance indépendante de l'ancrage des cellules HT-1080 dans l'agar mou, une caractéristique des cellules tumorigènes qui est indépendante de la protéolyse (Li *et al.*, 2004) mais reflète plutôt des altérations importantes dans la machinerie du cycle cellulaire et dans l'organisation du cytosquelette de la cellule (Pawlak et Helfman, 2001). En plus, puisque l'aneuploïdie est le résultat d'un dérèglement de la progression du cycle cellulaire via l'altération des points de contrôle de la mitose (Kops, Weaver et Cleveland, 2005) et qu'il a été démontré que la MT1-MMP confère l'aneuploïdie et la tumorigénicité aux cellules épithéliales normales par la dégradation protéolytique de la péricentrine par l'enzyme (Golubkov *et al.*, 2006), il est possible que le renversement de la polyploïdie induite par le mutant non phosphorylable de la MT1-MMP observé dans la présente thèse soit relié à un effet inhibiteur de ces processus. Bien que ces mécanismes restent à être identifiés au niveau moléculaire, ces résultats suggèrent néanmoins que la phosphorylation de la MT1-MMP sur sa tyrosine intracellulaire joue un rôle important dans les propriétés tumorigéniques des cellules cancéreuses.

À cet égard, nous avons observé qu'une conséquence importante de l'effet inhibiteur du mutant non phosphorylable de la MT1-MMP sur la prolifération et l'invasion tumorales est son habileté à prévenir la croissance tumorale chez la souris. Les cellules HT-1080 forment des tumeurs bien définies contenant de nombreux vaisseaux sanguins et des cellules ayant un taux de prolifération élevé, tel que rapporté précédemment (Nonaka *et al.*, 2005). Dans nos résultats, bien que toutes les cellules de la tumeur expriment la MT1-MMP, nous avons observé que la forme phosphorylée de l'enzyme était confinée à un certain nombre de cellules tumorales situées à proximité des vaisseaux associés aux tumeurs. Puisque les cellules tumorales situées à proximité de ces vaisseaux sanguins sont exposées à des concentrations en oxygène plus élevées et se divisent plus rapidement (Hoogsteen *et al.*, 2005 ; Pavelic, Allen et Mihich, 1981), la phosphorylation de la MT1-MMP préférentielle de ces cellules supporte un rôle potentiel important de l'enzyme phosphorylée dans la prolifération des cellules tumorales et renforce l'hypothèse selon laquelle l'effet dominant négatif du mutant de la MT1-MMP contre la phosphorylation de la MT1-MMP endogène observée *in vitro* est responsable de l'activité antitumorale du mutant *in vivo*.

Nos résultats sont en contradiction avec des études précédentes réalisées par d'autres équipes et montrant que même dans les cellules non invasives, la surexpression d'une forme de la MT1-MMP ne possédant plus la séquence cytoplasmique confère à ces cellules la capacité de proliférer dans des gels de collagène et d'envahir des barrières denses de MEC similaire à celle induite par la forme sauvage de l'enzyme (Hotary *et al.*, 2000 ; Hotary *et al.*, 2003 ; Hotary *et al.*, 2002). Bien que cet écart reste à être résolu, nous proposons que le mutant dominant négatif de la MT1-MMP altère la phosphorylation de la MT1-MMP endogène, induisant une compétition pour l'activation du programme d'invasion de la cellule. Cette compétition mènerait à une réduction de la progression du cycle et de la prolifération cellulaires, nonobstant une protéolyse adéquate de la matrice 3D environnante. Au contraire, dans les cellules exprimant le mutant de la MT1-MMP ne possédant plus le domaine intracellulaire, la protéolyse péricellulaire induite par l'enzyme diminue les restrictions de croissance imposées par l'environnement 3D, sans aucune interférence avec le programme d'invasion intrinsèque, et pourrait ainsi être suffisante pour conférer aux cellules en 3D un avantage de croissance et pour soutenir la progression tumorale (Hotary *et al.*, 2003).

Toutefois, un rôle essentiel du domaine intracellulaire de la MT1-MMP pour la croissance des cellules MCF-7 très peu invasives *in vivo* a été récemment rapporté (D'Alessio *et al.*, 2008), suggérant que le programme intrinsèque d'invasion des cellules tumorales dépendrait également de ce domaine.

Les résultats de nos travaux de recherche montrent sans contredit que la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine est nécessaire à la migration et l'invasion tumorale, de même qu'à la formation de xénogreffes chez la souris. Ces résultats nous ont donc mené à étudier le rôle de ce processus dans un modèle clinique de neuroblastome, une tumeur maligne de l'enfant qui, dans 60% des cas, démontre un mauvais pronostic pour les patients atteints de ce cancer.

À partir de 289 biopsies de patients atteints de neuroblastome, nous avons observé que l'expression de la MT1-MMP phosphorylée, bien que n'étant pas un facteur pronostic, était néanmoins corrélée avec un mauvais pronostic. Nous avons observé que la MT1-MMP phosphorylée était très peu exprimée dans les tumeurs qui régressent spontanément, suggérant ainsi que la MT1-MMP phosphorylée serait un marqueur de la progression du neuroblastome. La phosphorylation de la MT1-MMP serait donc un mécanisme décisionnel de la cellule tumorale, lui permettant d'« évoluer » en cancer.

Bien que le rôle important de la MT1-MMP dans l'invasion tumorale fait de cette enzyme une cible thérapeutique intéressante, la participation de cette enzyme au développement normal du squelette suggère que l'inhibition de son activité catalytique pourrait conduire à de graves effets secondaires (Overall et Kleifeld, 2006). Dans ce contexte, l'observation que la phosphorylation de la MT1-MMP sur sa tyrosine cytoplasmique joue un rôle important dans l'invasion tumorale et dans la progression du neuroblastome suggère que le fait de bloquer cet événement pourrait représenter une stratégie alternative pour inhiber la progression tumorale déclenchée par cette enzyme. À cette fin, nous avons conçu une molécule capable d'inhiber la phosphorylation de la MT1-MMP et la croissance tumorale subséquente.

L'effet dominant négatif du mutant non phosphorylable de la MT1-MMP sur l'enzyme endogène nous a conduit à la conception d'un peptide correspondant à la séquence cytoplasmique de la MT1-MMP où le résidu tyrosine a été remplacé par un résidu phénylalanine. De cette façon, nous pensions, en couplant ce peptide à une séquence perméable aux cellules, reproduire les effets inhibiteurs de l'invasion et la croissance tumorales observés avec le mutant non phosphorylable.

Nous avons observé que ce peptide, ACM-14, pouvait réduire les niveaux de phosphorylation de la MT1-MMP endogène des cellules tumorales. ACM-14 pouvait également réduire, à de très faibles concentrations de l'ordre du micromolaire, la prolifération de différents types de cellules tumorales dans un environnement 3D caractéristique des cellules tumorigéniques, par un mécanisme d'apoptose. Fait très intéressant, ACM-14 n'avait aucun effet sur les cellules tumorales cultivées sur des matrices bidimensionnelles, suggérant que l'action de ce peptide serait uniquement dans des conditions tumorigéniques. De plus, ACM-14 augmentait la survie des cellules portant des tumeurs en retardant considérablement la croissance des xénogreffes.

En raison de sa capacité à dégrader les composants de la MEC et son rôle central dans la progression tumorale, la MT1-MMP représente une cible intéressante pour le développement de thérapies anticancéreuses. Toutefois, tel que mentionné précédemment, les inhibiteurs de l'activité des MMPs décrits jusqu'à présent n'ont pas réussi à apporter des effets bénéfiques lors des essais cliniques, et induisaient également chez certains patients des effets secondaires musculosquelettiques sévères (Coussens, Fingleton et Matrisian, 2002 ; Overall et Kleinfeld, 2006). Bien que les mécanismes exacts impliqués dans ces effets ne sont pas encore élucidés, ils pourraient impliquer l'inhibition de l'activité protéolytique de la MT1-MMP (voir Figure 5.1) puisque des souris transgéniques chez lesquelles l'enzyme a été complètement enlevée présentent des malformations squelettiques sévères (Coussens, Fingleton et Matrisian, 2002 ; Overall et Kleinfeld, 2006). Dans ce contexte, l'identification de molécules qui altèrent la prolifération cellulaire *in vitro* et retardent significativement la

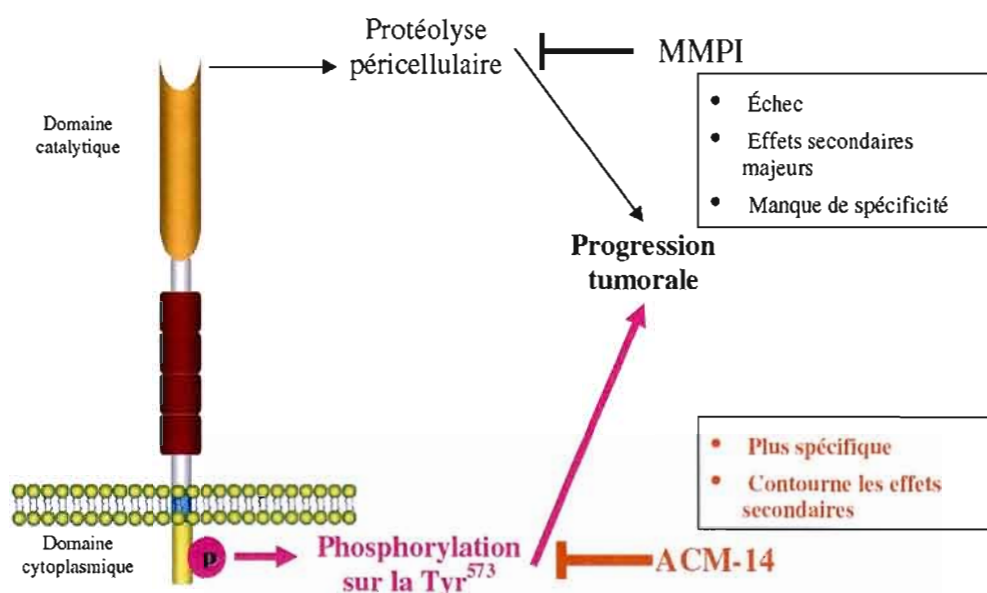


Figure 5.1 Nouvelle approche thérapeutique contre le cancer. Les études cliniques impliquant les inhibiteurs de MMP (MMPI) conventionnels ont échoué dû à leur manque de spécificité et leurs effets secondaires graves. Le peptide ACM-14 inhibe la phosphorylation et la MT1-MMP et la progression tumorale, sans affecter l'activité protéolytique. ACM-14 est plus spécifique et contournerait les effets secondaires causés par l'inhibition de l'activité protéolytique et le manque de spécificité.

progression tumorale chez la souris en interférant avec la phosphorylation de la MT1-MMP, tels que le peptide ACM-14 décrit dans la présente thèse, pourrait représenter une approche nouvelle et prometteuse pour inhiber cette enzyme (voir Figure 5.1). En effet, le peptide ACM-14 présente deux avantages majeurs ; d'une part, il inhibe la phosphorylation de la MT1-MMP en laissant son activité protéolytique intacte ; d'autre part, il cible uniquement les cellules cultivées dans des conditions tumorigènes (3D). Ces deux propriétés du peptide ACM-14 contribueraient à contourner les effets secondaires graves décrits lors de l'utilisation d'inhibiteurs classiques de MMP.

CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES

Durant la progression tumorale, les cellules cancéreuses doivent traverser et croître à l'intérieur de barrières 3D extrêmement denses composées de protéines de la MEC (Even-Ram et Yamada, 2005 ; Hanahan et Weinberg, 2000). Récemment, la protéolyse péricellulaire de la MEC induite par la MT1-MMP a émergé comme étant un mécanisme essentiel par lequel les cellules tumorales contournent la contrainte mécanique imposée par ces barrières 3D et acquièrent la capacité d'envahir et de proliférer dans ces environnements restrictifs pour la croissance (Hotary *et al.*, 2003).

Les résultats présentés dans cette thèse font la démonstration que, en plus de son activité catalytique essentielle, la MT1-MMP doit être phosphorylée sur sa tyrosine cytoplasmique afin de permettre aux cellules tumorales de proliférer et d'envahir les tissus. Nous démontrons également que la phosphorylation de la MT1-MMP est nécessaire à la formation de xénogreffes, et représente un facteur déterminant pour la progression du neuroblastome. Finalement, les travaux réalisés dans la présente thèse ont permis de concevoir un peptide pouvant inhiber la phosphorylation de la MT1-MMP et réduire ainsi la progression tumorale.

L'identification des mécanismes impliqués dans la phosphorylation de la MT1-MMP pourrait fournir des informations importantes concernant les voies de signalisation intracellulaires responsables du couplage de la protéolyse péricellulaire induite par la MT1-MMP à la prolifération des cellules tumorales. Bien que les résultats présentés dans cette thèse démontrent la présence nécessaire de la kinase Src dans le processus de phosphorylation de la MT1-MMP, aucune information ne permet d'affirmer que la kinase Src phosphoryle directement, au niveau cellulaire, la MT1-MMP. Il serait donc intéressant d'identifier la kinase responsable de la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine. À cet égard, certaines kinases - substrats de la kinase Src - représentent des

candidats potentiels pour la phosphorylation de la MT1-MMP. Un exemple intéressant est celui du récepteur de l'EGF (Scaltriti et Baselga, 2006). Des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré que la MT1-MMP interagit avec l'EGFR (Nyalendo, données non publiées) et transactive ce dernier, ce processus étant impliqué dans la migration cellulaire (Langlois *et al.*, 2007). De plus, d'autres investigateurs ont mis en évidence le rôle de l'EGFR dans l'internalisation de la MT1-MMP (Moss *et al.*, 2009). À la lueur de ces observations, l'EGFR pourrait représenter un candidat potentiel pour la phosphorylation de la MT1-MMP sur son résidu tyrosine intracellulaire.

Nous avons observé dans nos travaux la présence de la MT1-MMP phosphorylée dans le compartiment nucléaire. Il serait intéressant d'étudier les mécanismes menant à la translocation de la MT1-MMP dans le noyau, et de déterminer si la phosphorylation de la MT1-MMP déclenche ce processus. Des études préliminaires ont démontré que la nucléophosmine, une protéine nucléaire, interagissait avec la séquence cytoplasmique de la MT1-MMP, suggérant ainsi que la phosphorylation de cette enzyme serait impliquée dans la localisation nucléaire.

APPENDICE A

AUTRES CONTRIBUTIONS

- A.1 Membrane type-1 matrix metalloproteinase inhibitors and uses thereof.**
(Demande de Brevet, U.S. Provisional Application No. 61/138,375)
Béliveau R, Gingras D, Nyalendo C.
- A.2 Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase.**
Labrecque L, Nyalendo C, Langlois S, Durocher Y, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Béliveau R. 2004 *J. Biol. Chem.*, vol. 279, p. 52132-52140.
- A.3 Membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates cell migration through epidermal growth factor receptor transactivation.**
Langlois S, Nyalendo C, Di Tomasso G, Labrecque L, Roghi C, Murphy G, Gingras D, Béliveau R. 2007. *Mol. Cancer Res.*, vol. 5, p. 569-583.
- A.4 Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells.**
Gingras D, Michaud M, Di Tomasso G, Béliveau E, Nyalendo C, Béliveau R. 2008. *FEBS Lett.*, vol. 582, p. 399-404.

BIBLIOGRAPHIE

- Afzal, S., E. N. Lalani, R. Poulson, A. Stubbs, G. Rowlinson, H. Sato, M. Seiki et G. W. Stamp. 1998. «MT1-MMP and MMP-2 mRNA expression in human ovarian tumors: possible implications for the role of desmoplastic fibroblasts». *Hum Pathol.* vol. 29, no 2, p. 155-165.
- Ailenberg, M., et M. Silverman. 1996. «Cellular activation of mesangial gelatinase A by cytochalasin D is accompanied by enhanced mRNA expression of both gelatinase A and its membrane-associated gelatinase A activator (MT-MMP)». *Biochem J.* vol. 313 (Pt 3), p. 879-884.
- Andreasen, P. A., R. Egelund et H. H. Petersen. 2000. «The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis». *Cell Mol Life Sci.* vol. 57, no 1, p. 25-40.
- Anilkumar, N., T. Uekita, J. R. Couchman, H. Nagase, M. Seiki et Y. Itoh. 2005. «Palmitoylation at Cys574 is essential for MT1-MMP to promote cell migration». *Faseb J.* vol. 19, no 10, p. 1326-1328.
- Annabi, B., M. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras et R. Beliveau. 2001. «Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains». *Biochem J.* vol. 353, no Pt 3, p. 547-553.
- Ara, T., et Y. A. DeClerck. 2006. «Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma». *Cancer Metastasis Rev.* vol. 25, no 4, p. 645-657.
- Astrow, A. B. 1994. «Rethinking cancer». *Lancet.* vol. 343, no 8896, p. 494-495.
- Baciu, P. C., E. A. Suleiman, E. I. Deryugina et A. Y. Strongin. 2003. «Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) processing of pro-alpha_v integrin regulates cross-talk between alpha_vbeta₃ and alpha₂beta₁ integrins in breast carcinoma cells». *Exp Cell Res.* vol. 291, no 1, p. 167-175.
- Ballestrem, C., B. Hinz, B. A. Imhof et B. Wehrle-Haller. 2001. «Marching at the front and dragging behind: differential alpha_vbeta₃-integrin turnover regulates focal adhesion behavior». *J Cell Biol.* vol. 155, no 7, p. 1319-1332.
- Bando, E., Y. Yonemura, Y. Endou, T. Sasaki, K. Taniguchi, H. Fujita, S. Fushida, T. Fujimura, G. Nishimura, K. Miwa et M. Seiki. 1998. «Immunohistochemical study of MT-MMP tissue status in gastric carcinoma and correlation with survival analyzed by univariate and multivariate analysis». *Oncol Rep.* vol. 5, no 6, p. 1483-1488.

- Barbolina, M. V., et M. S. Stack. 2008. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis». *Semin Cell Dev Biol.* vol. 19, no 1, p. 24-33.
- Barrette, S., M. L. Bernstein, J. M. Leclerc, M. A. Champagne, Y. Samson, J. Brossard et W. G. Woods. 2006. «Treatment complications in children diagnosed with neuroblastoma during a screening program». *J Clin Oncol.* vol. 24, no 10, p. 1542-1545.
- Barrette, S., M. L. Bernstein, L. L. Robison, Y. Samson, J. Brossard, S. Weitzman et W. G. Woods. 2007. «Incidence of neuroblastoma after a screening program». *J Clin Oncol.* vol. 25, no 31, p. 4929-4932.
- Beardsley, A., K. Fang, H. Mertz, V. Castranova, S. Friend et J. Liu. 2005. «Loss of caveolin-1 polarity impedes endothelial cell polarization and directional movement». *J Biol Chem.* vol. 280, no 5, p. 3541-3547.
- Béliveau, Éric. 2005. «La MT1-MMP participe à la formation de complexes multimoléculaires incluant des protéines de transduction des signaux intracellulaires». Mémoire, Montréal, Département de Chimie, Université du Québec à Montréal.
- Belkin, A. M., S. S. Akimov, L. S. Zaritskaya, B. I. Ratnikov, E. I. Deryugina et A. Y. Strongin. 2001. «Matrix-dependent proteolysis of surface transglutaminase by membrane-type metalloproteinase regulates cancer cell adhesion and locomotion». *J Biol Chem.* vol. 276, no 21, p. 18415-18422.
- Bhushan, M., H. S. Young, P. E. Brenchley et C. E. Griffiths. 2002. «Recent advances in cutaneous angiogenesis». *Br J Dermatol.* vol. 147, no 3, p. 418-425.
- Bigg, H. F., C. J. Morrison, G. S. Butler, M. A. Bogoyevitch, Z. Wang, P. D. Soloway et C. M. Overall. 2001. «Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 inhibits but does not support the activation of gelatinase A via efficient inhibition of membrane type 1-matrix metalloproteinase». *Cancer Res.* vol. 61, no 9, p. 3610-3618.
- Birkedal-Hansen, H., W. G. Moore, M. K. Bodden, L. J. Windsor, B. Birkedal-Hansen, A. DeCarlo et J. A. Engler. 1993. «Matrix metalloproteinases: a review». *Crit Rev Oral Biol Med.* vol. 4, no 2, p. 197-250.
- Bock, E. 1991. «Cell-cell adhesion molecules». *Biochem Soc Trans.* vol. 19, no 4, p. 1076-1080.
- Brennes, R. M., R. Veve, F. R. Hirsch et W. A. Franklin. 2002. «The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis». *Lung Cancer.* vol. 36, no 2, p. 115-124.

- Bretscher, M. S. 1996. «Getting membrane flow and the cytoskeleton to cooperate in moving cells». *Cell*. vol. 87, no 4, p. 601-606.
- Brew, K., D. Dinakarpandian et H. Nagase. 2000. «Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function». *Biochim Biophys Acta*. vol. 1477, no 1-2, p. 267-283.
- Brinckerhoff, C. E., et L. M. Matrisian. 2002. «Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince». *Nat Rev Mol Cell Biol*. vol. 3, no 3, p. 207-214.
- Brodeur, G. M., R. C. Seeger, A. Barrett, F. Berthold, R. P. Castleberry, G. D'Angio, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, A. I. Freeman et et al. 1988. «International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma». *J Clin Oncol*. vol. 6, no 12, p. 1874-1881.
- Brooks, P. C., R. A. Clark et D. A. Cheresh. 1994. «Requirement of vascular integrin $\alpha v \beta 3$ for angiogenesis». *Science*. vol. 264, no 5158, p. 569-571.
- Buck, M. R., D. G. Karustis, N. A. Day, K. V. Honn et B. F. Sloane. 1992. «Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues». *Biochem J*. vol. 282 (Pt 1), p. 273-278.
- Butler, G. S., M. J. Butler, S. J. Atkinson, H. Will, T. Tamura, S. Schade van Westrum, T. Crabbe, J. Clements, M. P. d'Ortho et G. Murphy. 1998. «The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study». *J Biol Chem*. vol. 273, no 2, p. 871-880.
- Butler, G. S., D. Sim, E. Tam, D. Devine et C. M. Overall. 2002. «Mannose-binding lectin (MBL) mutants are susceptible to matrix metalloproteinase proteolysis: potential role in human MBL deficiency». *J Biol Chem*. vol. 277, no 20, p. 17511-17519.
- Cabodi, S., A. Tinnirello, P. Di Stefano, B. Bisaro, E. Ambrosino, I. Castellano, A. Sapino, R. Arisio, F. Cavallo, G. Forni, M. Glukhova, L. Silengo, F. Altruda, E. Turco, G. Tarone et P. Defilippi. 2006. «p130Cas as a new regulator of mammary epithelial cell proliferation, survival, and HER2-neu oncogene-dependent breast tumorigenesis». *Cancer Res*. vol. 66, no 9, p. 4672-4680.
- Cao, J., C. Chiarelli, P. Kozarekar et H. L. Adler. 2005. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase promotes human prostate cancer invasion and metastasis». *Thromb Haemost*. vol. 93, no 4, p. 770-778.
- Cha, H. J., A. Okada, K. W. Kim, H. Sato et M. Seiki. 2000. «Identification of cis-acting promoter elements that support expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in v-src transformed Madin-Darby canine kidney cells». *Clin Exp Metastasis*. vol. 18, no 8, p. 675-681.

- Chambers, A. F., A. C. Groom et L. C. MacDonald. 2002. «Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites». *Nat Rev Cancer*. vol. 2, no 8, p. 563-572.
- Chambers, A. F., et L. M. Matrisian. 1997. «Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis». *J Natl Cancer Inst*. vol. 89, no 17, p. 1260-1270.
- Chowdhury, I., B. Tharakan et G. K. Bhat. 2008. «Caspases - an update». *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. vol. 151, no 1, p. 10-27.
- Colditz, G. A., T. A. Sellers et E. Trapido. 2006. «Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer?». *Nat Rev Cancer*. vol. 6, no 1, p. 75-83.
- Condeelis, J., J. Jones et J. E. Segall. 1992. «Chemotaxis of metastatic tumor cells: clues to mechanisms from the Dictyostelium paradigm». *Cancer Metastasis Rev*. vol. 11, no 1, p. 55-68.
- Conner, S. D., et S. L. Schmid. 2003. «Regulated portals of entry into the cell». *Nature*. vol. 422, no 6927, p. 37-44.
- Coussens, L. M., B. Fingleton et L. M. Matrisian. 2002. «Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations». *Science*. vol. 295, no 5564, p. 2387-2392.
- Coussens, L. M., et Z. Werb. 2001. «Inflammatory cells and cancer: think different!». *J Exp Med*. vol. 193, no 6, p. F23-26.
- Covington, M. D., R. C. Burghardt et A. R. Parrish. 2006. «Ischemia-induced cleavage of cadherins in NRK cells requires MT1-MMP (MMP-14)». *Am J Physiol Renal Physiol*. vol. 290, no 1, p. F43-51.
- Cramer, L. P. 1999. «Organization and polarity of actin filament networks in cells: implications for the mechanism of myosin-based cell motility». *Biochem Soc Symp*. vol. 65, p. 173-205.
- Creemers, L. B., D. C. Jansen, A. van Veen-Reurings, T. van den Bos et V. Everts. 1997. «Microassay for the assessment of low levels of hydroxyproline». *Biotechniques*. vol. 22, no 4, p. 656-658.
- Cui, Y., F. Jean, G. Thomas et J. L. Christian. 1998. «BMP-4 is proteolytically activated by furin and/or PC6 during vertebrate embryonic development». *Embo J*. vol. 17, no 16, p. 4735-4743.
- Curran, S., et G. I. Murray. 1999. «Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis». *J Pathol*. vol. 189, no 3, p. 300-308.
- D'Alessio, S., G. Ferrari, K. Cinnante, W. Scheerer, A. C. Galloway, D. F. Roses, D. V. Rozanov, A. G. Remacle, E. S. Oh, S. A. Shiryayev, A. Y. Strongin, G. Pintucci et P.

- Mignatti. 2008. «Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism». *J Biol Chem.* vol. 283, no 1, p. 87-99. En ligne. <<http://www.jbc.org/cgi/content/full/283/1/87>>.
- d'Ortho, M. P., H. Will, S. Atkinson, G. Butler, A. Messent, J. Gavrilovic, B. Smith, R. Timpl, L. Zardi et G. Murphy. 1997. «Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases». *Eur J Biochem.* vol. 250, no 3, p. 751-757. En ligne. <<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1432-1033.1997.00751.x>>.
- Deryugina, E. I., L. Soroceanu et A. Y. Strongin. 2002. «Up-regulation of vascular endothelial growth factor by membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates human glioma xenograft growth and angiogenesis». *Cancer Res.* vol. 62, no 2, p. 580-588.
- Edwards, D. R., et G. Murphy. 1998. «Cancer. Proteases--invasion and more». *Nature.* vol. 394, no 6693, p. 527-528.
- Egeblad, M., et Z. Werb. 2002. «New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression». *Nat Rev Cancer.* vol. 2, no 3, p. 161-174.
- Ekblom, P. 1996. «Receptors for laminins during epithelial morphogenesis». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 8, no 5, p. 700-706.
- Endo, K., T. Takino, H. Miyamori, H. Kinsen, T. Yoshizaki, M. Furukawa et H. Sato. 2003. «Cleavage of syndecan-1 by membrane type matrix metalloproteinase-1 stimulates cell migration». *J Biol Chem.* vol. 278, no 42, p. 40764-40770.
- Even-Ram, S., et K. M. Yamada. 2005. «Cell migration in 3D matrix». *Curr Opin Cell Biol.* vol. 17, no 5, p. 524-532.
- Farina, K. L., J. B. Wyckoff, J. Rivera, H. Lee, J. E. Segall, J. S. Condeelis et J. G. Jones. 1998. «Cell motility of tumor cells visualized in living intact primary tumors using green fluorescent protein». *Cancer Res.* vol. 58, no 12, p. 2528-2532.
- Felding-Habermann, B., B. M. Mueller, C. A. Romerdahl et D. A. Cheresh. 1992. «Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity». *J Clin Invest.* vol. 89, no 6, p. 2018-2022.
- Ferrara, N., et K. Alitalo. 1999. «Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors». *Nat Med.* vol. 5, no 12, p. 1359-1364.
- Filardo, E. J., P. C. Brooks, S. L. Deming, C. Damsky et D. A. Cheresh. 1995. «Requirement of the NPXY motif in the integrin beta 3 subunit cytoplasmic tail for melanoma cell migration in vitro and in vivo». *J Cell Biol.* vol. 130, no 2, p. 441-450.

- Fishman, D. A., L. M. Bafetti et M. S. Stack. 1996. «Membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in primary human ovarian epithelial carcinoma cells». *Invasion Metastasis*. vol. 16, no 3, p. 150-159.
- Folgueras, A. R., A. M. Pendas, L. M. Sanchez et C. Lopez-Otin. 2004. «Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies». *Int J Dev Biol*. vol. 48, no 5-6, p. 411-424.
- Folkman, J. 1971. «Tumor angiogenesis: therapeutic implications». *N Engl J Med*. vol. 285, no 21, p. 1182-1186.
- , 1990. «What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?». *J Natl Cancer Inst*. vol. 82, no 1, p. 4-6.
- , 1995. «Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease». *Nat Med*. vol. 1, no 1, p. 27-31.
- Follows, E. R., J. C. McPheat, C. Minshull, N. C. Moore, R. A. Pauptit, S. Rowsell, C. L. Stacey, J. J. Stanway, I. W. Taylor et W. M. Abbott. 2001. «Study of the interaction of the medium chain mu 2 subunit of the clathrin-associated adapter protein complex 2 with cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 and CD28». *Biochem J*. vol. 359, no Pt 2, p. 427-434.
- Forsyth, P. A., H. Wong, T. D. Laing, N. B. Rewcastle, D. G. Morris, H. Muzik, K. J. Leco, R. N. Johnston, P. M. Brasher, G. Sutherland et D. R. Edwards. 1999. «Gelatinase-A (MMP-2), gelatinase-B (MMP-9) and membrane type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) are involved in different aspects of the pathophysiology of malignant gliomas». *Br J Cancer*. vol. 79, no 11-12, p. 1828-1835.
- Friedl, P., S. Borgmann et E. B. Brouck. 2001. «Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement». *J Leukoc Biol*. vol. 70, no 4, p. 491-509.
- Friedl, P., et K. Wolf. 2003. «Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms». *Nat Rev Cancer*. vol. 3, no 5, p. 362-374.
- Frixen, U. H., J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Lochner et W. Birchmeier. 1991. «E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells». *J Cell Biol*. vol. 113, no 1, p. 173-185.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, J. P. Albar, F. Sanchez-Madrid et A. G. Arroyo. 2001. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase is activated during migration of human endothelial cells and modulates endothelial motility and matrix remodeling». *J Biol Chem*. vol. 276, no 40, p. 37491-37500.

- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, F. Sanchez-Madrid et A. G. Arroyo. 2002. «ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells». *J Cell Biol.* vol. 159, no 3, p. 509-521.
- Galvez, B. G., S. Matias-Roman, M. Yanez-Mo, M. Vicente-Manzanares, F. Sanchez-Madrid et A. G. Arroyo. 2004. «Caveolae are a novel pathway for membrane-type 1 matrix metalloproteinase traffic in human endothelial cells». *Mol Biol Cell.* vol. 15, no 2, p. 678-687.
- Gilles, C., M. Polette, M. Seiki, P. Birembaut et E. W. Thompson. 1997. «Implication of collagen type I-induced membrane-type 1-matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation in the metastatic progression of breast carcinoma». *Lab Invest.* vol. 76, no 5, p. 651-660.
- Gingras, D., et R. Beliveau. 2009. «Emerging concepts in the regulation of membrane-type 1 matrix metalloproteinase activity». *Biochim Biophys Acta.*
- Gingras, D., N. Bousquet-Gagnon, S. Langlois, M. P. Lachambre, B. Annabi et R. Beliveau. 2001. «Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *FEBS Lett.* vol. 507, no 2, p. 231-236. En ligne.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T36-446V9H8-B&_user=789722&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000043357&_version=1&_urlVersion=0&_userid=789722&md5=002540da1c759a8d2f3604d723d8db38.
- Gingras, D., M. Michaud, G. Di Tomasso, E. Beliveau, C. Nyalendo et R. Beliveau. 2007. «Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells». *FEBS Lett.* En ligne.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T36-4RFT022-1&_user=789722&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&_view=c&_acct=C000043357&_version=1&_urlVersion=0&_userid=789722&md5=32931e2d06af715bb9b73622d451a262.
- , 2008. «Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells». *FEBS Lett.* vol. 582, no 3, p. 399-404.
- Gocheva, V., W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, D. Hanahan et J. A. Joyce. 2006. «Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis». *Genes Dev.* vol. 20, no 5, p. 543-556.
- Golubkov, V. S., S. Boyd, A. Y. Savinov, A. V. Chekanov, A. L. Osterman, A. Remacle, D. V. Rozanov, S. J. Doxsey et A. Y. Strongin. 2005. «Membrane type-1 matrix

- metalloproteinase (MT1-MMP) exhibits an important intracellular cleavage function and causes chromosome instability». *J Biol Chem.* vol. 280, no 26, p. 25079-25086.
- Golubkov, V. S., A. V. Chekanov, S. J. Doxsey et A. Y. Strongin. 2005. «Centrosomal pericentrin is a direct cleavage target of membrane type-1 matrix metalloproteinase in humans but not in mice: potential implications for tumorigenesis». *J Biol Chem.* vol. 280, no 51, p. 42237-42241.
- Golubkov, V. S., A. V. Chekanov, A. Y. Savinov, D. V. Rozanov, N. V. Golubkova et A. Y. Strongin. 2006. «Membrane type-1 matrix metalloproteinase confers aneuploidy and tumorigenicity on mammary epithelial cells». *Cancer Res.* vol. 66, no 21, p. 10460-10465.
- Griffioen, A. W., et G. Molema. 2000. «Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation». *Pharmacol Rev.* vol. 52, no 2, p. 237-268.
- Gross, J., et C. M. Lapiere. 1962. «Collagenolytic activity in amphibian tissues: a tissue culture assay». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 48, p. 1014-1022.
- Gurney, J. G., R. K. Severson, S. Davis et L. L. Robison. 1995. «Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type». *Cancer.* vol. 75, no 8, p. 2186-2195.
- Gururajan, R., J. M. Lahti, J. Grenet, J. Easton, I. Gruber, P. F. Ambros et V. J. Kidd. 1998. «Duplication of a genomic region containing the Cdc2L1-2 and MMP21-22 genes on human chromosome 1p36.3 and their linkage to D1Z2». *Genome Res.* vol. 8, no 9, p. 929-939.
- Haas, T. L. 2005. «Endothelial cell regulation of matrix metalloproteinases». *Can J Physiol Pharmacol.* vol. 83, no 1, p. 1-7.
- Hanahan, D., et J. Folkman. 1996. «Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis». *Cell.* vol. 86, no 3, p. 353-364.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2000. «The hallmarks of cancer». *Cell.* vol. 100, no 1, p. 57-70.
- Harada, T., S. Arii, M. Mise, T. Imamura, H. Higashitsuji, M. Furutani, M. Niwano, S. Ishigami, M. Fukumoto, M. Seiki, H. Sato et M. Imamura. 1998. «Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MTP) gene is overexpressed in highly invasive hepatocellular carcinomas». *J Hepatol.* vol. 28, no 2, p. 231-239.
- Hase, T., S. Ohta, T. Tani, T. Mizukuro, E. Mekata, H. Naitoh, S. Shimadera, S. Fujino et T. Taga. 2002. «Outcome of infants with neuroblastoma detected by mass screening and

- surgically treated in Shiga Prefecture, Japan: what is the role of surgery?». *Pediatr Surg Int.* vol. 18, no 5-6, p. 289-294.
- Hiller, O., A. Lichte, A. Oberpichler, A. Kocourek et H. Tschesche. 2000. «Matrix metalloproteinases collagenase-2, macrophage elastase, collagenase-3, and membrane type 1-matrix metalloproteinase impair clotting by degradation of fibrinogen and factor XII». *J Biol Chem.* vol. 275, no 42, p. 33008-33013.
- Hiraoka, N., E. Allen, I. J. Apel, M. R. Gyetko et S. J. Weiss. 1998. «Matrix metalloproteinases regulate neovascularization by acting as pericellular fibrinolysins». *Cell.* vol. 95, no 3, p. 365-377.
- Hobson, B., et J. Denekamp. 1984. «Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies». *Br J Cancer.* vol. 49, no 4, p. 405-413.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, A. J. Zendman, J. C. Becker, D. J. Ruiter et G. N. van Muijen. 2000. «Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression». *J Pathol.* vol. 191, no 3, p. 245-256.
- Holmbeck, K., P. Bianco, J. Caterina, S. Yamada, M. Kromer, S. A. Kuznetsov, M. Mankani, P. G. Robey, A. R. Poole, I. Pidoux, J. M. Ward et H. Birkedal-Hansen. 1999. «MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover». *Cell.* vol. 99, no 1, p. 81-92.
- Holopainen, J. M., J. A. Moilanen, T. Sorsa, M. Kivela-Rajamaki, T. Tervahartiala, M. H. Vesaluoma et T. M. Tervo. 2003. «Activation of matrix metalloproteinase-8 by membrane type 1-MMP and their expression in human tears after photorefractive keratectomy». *Invest Ophthalmol Vis Sci.* vol. 44, no 6, p. 2550-2556.
- Hood, J. D., et D. A. Cheresh. 2002. «Role of integrins in cell invasion and migration». *Nat Rev Cancer.* vol. 2, no 2, p. 91-100.
- Hoogsteen, I. J., H. A. Marres, K. I. Wijffels, P. F. Rijken, J. P. Peters, F. J. van den Hoogen, E. Oosterwijk, A. J. van der Kogel et J. H. Kaanders. 2005. «Colocalization of carbonic anhydrase 9 expression and cell proliferation in human head and neck squamous cell carcinoma». *Clin Cancer Res.* vol. 11, no 1, p. 97-106.
- Hotary, K., E. Allen, A. Punturieri, I. Yana et S. J. Weiss. 2000. «Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3». *J Cell Biol.* vol. 149, no 6, p. 1309-1323.
- Hotary, K. B., E. D. Allen, P. C. Brooks, N. S. Datta, M. W. Long et S. J. Weiss. 2003. «Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix». *Cell.* vol. 114, no 1, p. 33-45.

- Hotary, K. B., I. Yana, F. Sabeh, X. Y. Li, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, E. D. Allen, N. Hiraoka et S. J. Weiss. 2002. «Matrix metalloproteinases (MMPs) regulate fibrin-invasive activity via MT1-MMP-dependent and -independent processes». *J Exp Med.* vol. 195, no 3, p. 295-308.
- Hotary, K., X. Y. Li, E. Allen, S. L. Stevens et S. J. Weiss. 2006. «A cancer cell metalloprotease triad regulates the basement membrane transmigration program». *Genes Dev.* vol. 20, no 19, p. 2673-2686.
- Hsu, M. Y., F. E. Meier, M. Nesbit, J. Y. Hsu, P. Van Belle, D. E. Elder et M. Herlyn. 2000. «E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors». *Am J Pathol.* vol. 156, no 5, p. 1515-1525.
- Hyder, S. M., et G. M. Stancel. 1999. «Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins». *Mol Endocrinol.* vol. 13, no 6, p. 806-811.
- Hynes, R. O. 2002. «Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines». *Cell.* vol. 110, no 6, p. 673-687.
- Ilyas, M., J. Straub, I. P. Tomlinson et W. F. Bodmer. 1999. «Genetic pathways in colorectal and other cancers». *Eur J Cancer.* vol. 35, no 14, p. 1986-2002.
- Imai, K., E. Ohuchi, T. Aoki, H. Nomura, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1996. «Membrane-type matrix metalloproteinase 1 is a gelatinolytic enzyme and is secreted in a complex with tissue inhibitor of metalloproteinases 2». *Cancer Res.* vol. 56, no 12, p. 2707-2710.
- Imamura, T., G. Ohshio, M. Mise, T. Harada, H. Suwa, N. Okada, Z. Wang, S. Yoshitomi, T. Tanaka, H. Sato, S. Arii, M. Seiki et M. Imamura. 1998. «Expression of membrane-type matrix metalloproteinase-1 in human pancreatic adenocarcinomas». *J Cancer Res Clin Oncol.* vol. 124, no 2, p. 65-72.
- Ip, Y. C., S. T. Cheung et S. T. Fan. 2007. «Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma». *Mol Carcinog.* vol. 46, no 3, p. 225-230.
- Ishidoh, K., et E. Kominami. 1995. «Procathepsin L degrades extracellular matrix proteins in the presence of glycosaminoglycans in vitro». *Biochem Biophys Res Commun.* vol. 217, no 2, p. 624-631.
- Ishigaki, S., M. Toi, T. Ueno, H. Matsumoto, M. Muta, M. Koike et M. Seiki. 1999. «Significance of membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in breast cancer». *Jpn J Cancer Res.* vol. 90, no 5, p. 516-522.

- Ishola, T. A., et D. H. Chung. 2007. «Neuroblastoma». *Surg Oncol.* vol. 16, no 3, p. 149-156.
- Itoh, Y. 2006. «MT1-MMP: a key regulator of cell migration in tissue». *IUBMB Life.* vol. 58, no 10, p. 589-596.
- Itoh, Y., et M. Seiki. 2006. «MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment». *J Cell Physiol.* vol. 206, no 1, p. 1-8.
- Itoh, Y., A. Takamura, N. Ito, Y. Maru, H. Sato, N. Suenaga, T. Aoki et M. Seiki. 2001. «Homophilic complex formation of MT1-MMP facilitates proMMP-2 activation on the cell surface and promotes tumor cell invasion». *Embo J.* vol. 20, no 17, p. 4782-4793.
- Jean, F., K. Stella, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, A. J. Reason et G. Thomas. 1998. «alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 95, no 13, p. 7293-7298.
- Jiang, A., K. Lehti, X. Wang, S. J. Weiss, J. Keski-Oja et D. Pei. 2001. «Regulation of membrane-type matrix metalloproteinase 1 activity by dynamin-mediated endocytosis». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 98, no 24, p. 13693-13698.
- Kaibuchi, K., S. Kuroda et M. Amano. 1999. «Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells». *Annu Rev Biochem.* vol. 68, p. 459-486.
- Kajita, M., Y. Itoh, T. Chiba, H. Mori, A. Okada, H. Kinoh et M. Seiki. 2001. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration». *J Cell Biol.* vol. 153, no 5, p. 893-904.
- Kanayama, H., K. Yokota, Y. Kurokawa, Y. Murakami, M. Nishitani et S. Kagawa. 1998. «Prognostic values of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in bladder cancer». *Cancer.* vol. 82, no 7, p. 1359-1366.
- Katoh, K., Y. Kano, M. Amano, H. Onishi, K. Kaibuchi et K. Fujiwara. 2001. «Rho-kinase-mediated contraction of isolated stress fibers». *J Cell Biol.* vol. 153, no 3, p. 569-584.
- Kazes, I., F. Delarue, J. Hagege, L. Bouzahir-Sima, E. Rondeau, J. D. Sraer et G. Nguyen. 1998. «Soluble latent membrane-type 1 matrix metalloprotease secreted by human mesangial cells is activated by urokinase». *Kidney Int.* vol. 54, no 6, p. 1976-1984.
- Knauper, V., L. Bailey, J. R. Worley, P. Soloway, M. L. Patterson et G. Murphy. 2002. «Cellular activation of proMMP-13 by MT1-MMP depends on the C-terminal domain of MMP-13». *FEBS Lett.* vol. 532, no 1-2, p. 127-130.

- Knauper, V., H. Will, C. Lopez-Otin, B. Smith, S. J. Atkinson, H. Stanton, R. M. Hembry et G. Murphy. 1996. «Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme». *J Biol Chem.* vol. 271, no 29, p. 17124-17131.
- Koch, A. E. 1998. «Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis». *Arthritis Rheum.* vol. 41, no 6, p. 951-962.
- Koo, H. M., J. H. Kim, I. K. Hwang, S. J. Lee, T. H. Kim, K. H. Rhee et S. T. Lee. 2002. «Refolding of the catalytic and hinge domains of human MT1-mMP expressed in *Escherichia coli* and its characterization». *Mol Cells.* vol. 13, no 1, p. 118-124.
- Kops, G. J., B. A. Weaver et D. W. Cleveland. 2005. «On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint». *Nat Rev Cancer.* vol. 5, no 10, p. 773-785.
- Koshikawa, N., G. Giannelli, V. Cirulli, K. Miyazaki et V. Quaranta. 2000. «Role of cell surface metalloprotease MT1-MMP in epithelial cell migration over laminin-5». *J Cell Biol.* vol. 148, no 3, p. 615-624.
- Koshikawa, N., T. Minegishi, A. Sharabi, V. Quaranta et M. Seiki. 2005. «Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain». *J Biol Chem.* vol. 280, no 1, p. 88-93.
- Labrecque, L., C. Nyalendo, S. Langlois, Y. Durocher, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2004. «Src-mediated tyrosine phosphorylation of caveolin-1 induces its association with membrane type 1 matrix metalloproteinase». *J Biol Chem.* vol. 279, no 50, p. 52132-52140.
- Langlois, S., G. Di Tomasso, D. Boivin, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2005. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism». *Exp Cell Res.* vol. 307, no 2, p. 452-464.
- Langlois, S., D. Gingras et R. Beliveau. 2004. «Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation». *Blood.* vol. 103, no 8, p. 3020-3028.
- Langlois, S., C. Nyalendo, G. Di Tomasso, L. Labrecque, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates cell migration through epidermal growth factor receptor transactivation». *Mol Cancer Res.* vol. 5, no 6, p. 569-583.
- Lee, J. H., M. E. Miele, D. J. Hicks, K. K. Phillips, J. M. Trent, B. E. Weissman et D. R. Welch. 1996. «KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene». *J Natl Cancer Inst.* vol. 88, no 23, p. 1731-1737.

- Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri et E. W. Thompson. 2006. «The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease». *J Cell Biol.* vol. 172, no 7, p. 973-981.
- Lehti, K., E. Allen, H. Birkedal-Hansen, K. Holmbeck, Y. Miyake, T. H. Chun et S. J. Weiss. 2005. «An MT1-MMP-PDGF receptor-beta axis regulates mural cell investment of the microvasculature». *Genes Dev.* vol. 19, no 8, p. 979-991.
- Lehti, K., J. Lohi, M. M. Juntunen, D. Pei et J. Keski-Oja. 2002. «Oligomerization through hemopexin and cytoplasmic domains regulates the activity and turnover of membrane-type 1 matrix metalloproteinase». *J Biol Chem.* vol. 277, no 10, p. 8440-8448.
- Lehti, K., J. Lohi, H. Valtanen et J. Keski-Oja. 1998. «Proteolytic processing of membrane-type-1 matrix metalloproteinase is associated with gelatinase A activation at the cell surface». *Biochem J.* vol. 334 (Pt 2), p. 345-353.
- Lehti, K., H. Valtanen, S. A. Wickstrom, J. Lohi et J. Keski-Oja. 2000. «Regulation of membrane-type-1 matrix metalloproteinase activity by its cytoplasmic domain». *J Biol Chem.* vol. 275, no 20, p. 15006-15013.
- Li, Y., T. Aoki, Y. Mori, M. Ahmad, H. Miyamori, T. Takino et H. Sato. 2004. «Cleavage of lumican by membrane-type matrix metalloproteinase-1 abrogates this proteoglycan-mediated suppression of tumor cell colony formation in soft agar». *Cancer Res.* vol. 64, no 19, p. 7058-7064.
- Lin, C. Q., et M. J. Bissell. 1993. «Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix». *Faseb J.* vol. 7, no 9, p. 737-743.
- Llano, E., A. M. Pendas, J. P. Freije, A. Nakano, V. Knauper, G. Murphy et C. Lopez-Otin. 1999. «Identification and characterization of human MT5-MMP, a new membrane-bound activator of progelatinase a overexpressed in brain tumors». *Cancer Res.* vol. 59, no 11, p. 2570-2576.
- Lo, H. W., S. C. Hsu et M. C. Hung. 2006. «EGFR signaling pathway in breast cancers: from traditional signal transduction to direct nuclear translocalization». *Breast Cancer Res Treat.* vol. 95, no 3, p. 211-218.
- Lohi, J., K. Lehti, H. Valtanen, W. C. Parks et J. Keski-Oja. 2000. «Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene». *Gene.* vol. 242, no 1-2, p. 75-86.
- Luo, J., D. M. Lubaroff et M. J. Hendrix. 1999. «Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection». *Cancer Res.* vol. 59, no 15, p. 3552-3556.

- Mai, J., M. Sameni, T. Mikkelsen et B. F. Sloane. 2002. «Degradation of extracellular matrix protein tenascin-C by cathepsin B: an interaction involved in the progression of gliomas». *Biol Chem.* vol. 383, no 9, p. 1407-1413.
- Mandell, J. W. 2003. «Phosphorylation state-specific antibodies: applications in investigative and diagnostic pathology». *Am J Pathol.* vol. 163, no 5, p. 1687-1698.
- Maris, J. M. 2005. «The biologic basis for neuroblastoma heterogeneity and risk stratification». *Curr Opin Pediatr.* vol. 17, no 1, p. 7-13.
- McQuibban, G. A., G. S. Butler, J. H. Gong, L. Bendall, C. Power, I. Clark-Lewis et C. M. Overall. 2001. «Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1». *J Biol Chem.* vol. 276, no 47, p. 43503-43508.
- McQuibban, G. A., J. H. Gong, J. P. Wong, J. L. Wallace, I. Clark-Lewis et C. M. Overall. 2002. «Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo». *Blood.* vol. 100, no 4, p. 1160-1167.
- Mizejewski, G. J. 1999. «Role of integrins in cancer: survey of expression patterns». *Proc Soc Exp Biol Med.* vol. 222, no 2, p. 124-138.
- Mohamed, M. M., et B. F. Sloane. 2006. «Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer». *Nat Rev Cancer.* vol. 6, no 10, p. 764-775.
- Mori, M., K. Mimori, T. Shiraishi, T. Fujie, K. Baba, H. Kusumoto, M. Haraguchi, H. Ueo et T. Akiyoshi. 1997. «Analysis of MT1-MMP and MMP2 expression in human gastric cancers». *Int J Cancer.* vol. 74, no 3, p. 316-321.
- Morrison, C. J., G. S. Butler, H. F. Bigg, C. R. Roberts, P. D. Soloway et C. M. Overall. 2001. «Cellular activation of MMP-2 (gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway». *J Biol Chem.* vol. 276, no 50, p. 47402-47410.
- Moss, N. M., Y. Liu, J. J. Johnson, P. Debiase, J. Jones, L. G. Hudson, H. G. Munshi et M. S. Stack. 2009. «Epidermal growth factor receptor-mediated membrane type 1 matrix metalloproteinase endocytosis regulates the transition between invasive versus expansive growth of ovarian carcinoma cells in three-dimensional collagen». *Mol Cancer Res.* vol. 7, no 6, p. 809-820.
- Mu, D., S. Cambier, L. Fjellbirkeland, J. L. Baron, J. S. Munger, H. Kawakatsu, D. Sheppard, V. C. Broaddus et S. L. Nishimura. 2002. «The integrin alpha(v)beta8 mediates epithelial homeostasis through MT1-MMP-dependent activation of TGF-beta1». *J Cell Biol.* vol. 157, no 3, p. 493-507.
- Munaut, C., A. Noel, O. Hougrand, J. M. Foidart, J. Boniver et M. Deprez. 2003. «Vascular endothelial growth factor expression correlates with matrix metalloproteinases MT1-

- MMP, MMP-2 and MMP-9 in human glioblastomas». *Int J Cancer*. vol. 106, no 6, p. 848-855.
- Munoz-Chapuli, R., A. R. Quesada et M. Angel Medina. 2004. «Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells». *Cell Mol Life Sci*. vol. 61, no 17, p. 2224-2243.
- Nagase, H., et J. F. Woessner, Jr. 1999. «Matrix metalloproteinases». *J Biol Chem*. vol. 274, no 31, p. 21491-21494.
- Nakada, M., H. Nakamura, E. Ikeda, N. Fujimoto, J. Yamashita, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1999. «Expression and tissue localization of membrane-type 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human astrocytic tumors». *Am J Pathol*. vol. 154, no 2, p. 417-428.
- Nakada, M., A. Yamada, T. Takino, H. Miyamori, T. Takahashi, J. Yamashita et H. Sato. 2001. «Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes». *Cancer Res*. vol. 61, no 24, p. 8896-8902.
- Nakahara, H., L. Howard, E. W. Thompson, H. Sato, M. Seiki, Y. Yeh et W. T. Chen. 1997. «Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 94, no 15, p. 7959-7964.
- Nakamura, H., H. Ueno, K. Yamashita, T. Shimada, E. Yamamoto, M. Noguchi, N. Fujimoto, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1999. «Enhanced production and activation of progelatinase A mediated by membrane-type 1 matrix metalloproteinase in human papillary thyroid carcinomas». *Cancer Res*. vol. 59, no 2, p. 467-473.
- Naor, D., R. V. Sionov et D. Ish-Shalom. 1997. «CD44: structure, function, and association with the malignant process». *Adv Cancer Res*. vol. 71, p. 241-319.
- Nawrocki, B., M. Polette, V. Marchand, M. Monteau, P. Gillery, J. M. Tournier et P. Birembaut. 1997. «Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in human bronchopulmonary carcinomas: quantitative and morphological analyses». *Int J Cancer*. vol. 72, no 4, p. 556-564.
- Noe, V., B. Fingleton, K. Jacobs, H. C. Crawford, S. Vermeulen, W. Steelant, E. Bruyneel, L. M. Matrisian et M. Mareel. 2001. «Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1». *J Cell Sci*. vol. 114, no Pt 1, p. 111-118.
- Nomura, H., H. Sato, M. Seiki, M. Mai et Y. Okada. 1995. «Expression of membrane-type matrix metalloproteinase in human gastric carcinomas». *Cancer Res*. vol. 55, no 15, p. 3263-3266.

- Nonaka, T., K. Nishibashi, Y. Itoh, I. Yana et M. Seiki. 2005. «Competitive disruption of the tumor-promoting function of membrane type 1 matrix metalloproteinase/matrix metalloproteinase-14 in vivo». *Mol Cancer Ther.* vol. 4, no 8, p. 1157-1166.
- Nyalendo, C., E. Beaulieu, H. Sartelet, M. Michaud, N. Fontaine, D. Gingras et R. Beliveau. 2008. «Impaired tyrosine phosphorylation of membrane type 1-matrix metalloproteinase reduces tumor cell proliferation in three-dimensional matrices and abrogates tumor growth in mice». *Carcinogenesis.* vol. 29, no 8, p. 1655-1664.
- Nyalendo, C., M. Michaud, E. Beaulieu, C. Roghi, G. Murphy, D. Gingras et R. Beliveau. 2007. «Src-dependent phosphorylation of membrane type I matrix metalloproteinase on cytoplasmic tyrosine 573: role in endothelial and tumor cell migration». *J Biol Chem.* vol. 282, no 21, p. 15690-15699.
- Oh, J., R. Takahashi, S. Kondo, A. Mizoguchi, E. Adachi, R. M. Sasahara, S. Nishimura, Y. Imamura, H. Kitayama, D. B. Alexander, C. Ide, T. P. Horan, T. Arakawa, H. Yoshida, S. Nishikawa, Y. Itoh, M. Seiki, S. Itohara, C. Takahashi et M. Noda. 2001. «The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis». *Cell.* vol. 107, no 6, p. 789-800.
- Ohtani, H., H. Motohashi, H. Sato, M. Seiki et H. Nagura. 1996. «Dual over-expression pattern of membrane-type metalloproteinase-1 in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by in situ hybridization and immunoelectron microscopy». *Int J Cancer.* vol. 68, no 5, p. 565-570.
- Ohuchi, E., K. Imai, Y. Fujii, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1997. «Membrane type 1 matrix metalloproteinase digests interstitial collagens and other extracellular matrix macromolecules». *J Biol Chem.* vol. 272, no 4, p. 2446-2451.
- Okada, A., J. P. Bellocq, N. Rouyer, M. P. Chenard, M. C. Rio, P. Chambon et P. Basset. 1995. «Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 92, no 7, p. 2730-2734.
- Okamoto, I., Y. Kawano, D. Murakami, T. Sasayama, N. Araki, T. Miki, A. J. Wong et H. Saya. 2001. «Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway». *J Cell Biol.* vol. 155, no 5, p. 755-762.
- Okumura, Y., H. Sato, M. Seiki et H. Kido. 1997. «Proteolytic activation of the precursor of membrane type 1 matrix metalloproteinase by human plasmin. A possible cell surface activator». *FEBS Lett.* vol. 402, no 2-3, p. 181-184.
- Overall, C. M., et O. Kleinfeld. 2006. «Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy». *Nat Rev Cancer.* vol. 6, no 3, p. 227-239.

- Page-McCaw, A., A. J. Ewald et Z. Werb. 2007. «Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling». *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 8, no 3, p. 221-233.
- Paulus, W., I. Baur, A. S. Beutler et S. A. Reeves. 1996. «Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins». *Lab Invest.* vol. 75, no 6, p. 819-826.
- Pavelic, Z. P., L. M. Allen et E. Mihich. 1981. «The relationship of blood vessel proximity and time after radiolabeled thymidine administration to tumor cell population kinetics in a transplanted mouse mammary tumor». *Am J Pathol.* vol. 102, no 1, p. 84-89.
- Pawlak, G., et D. M. Helfman. 2001. «Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis». *Curr Opin Genet Dev.* vol. 11, no 1, p. 41-47.
- Pei, D., et S. J. Weiss. 1996. «Transmembrane-deletion mutants of the membrane-type matrix metalloproteinase-1 process progelatinase A and express intrinsic matrix-degrading activity». *J Biol Chem.* vol. 271, no 15, p. 9135-9140.
- Pepper, M. S. 2001. «Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis». *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* vol. 21, no 7, p. 1104-1117.
- Pepper, M. S., D. Baetens, S. J. Mandriota, C. Di Sanza, S. Oikemus, T. F. Lane, J. V. Soriano, R. Montesano et M. L. Iruela-Arispe. 2000. «Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution». *Dev Dyn.* vol. 218, no 3, p. 507-524.
- Pilorget, A., B. Annabi, F. Bouzeghrane, J. Marvaldi, J. Luis et R. Beliveau. 2005. «Inhibition of angiogenic properties of brain endothelial cells by platelet-derived sphingosine-1-phosphate». *J Cereb Blood Flow Metab.* vol. 25, no 9, p. 1171-1182.
- Polette, M., C. Gilles, S. de Bentzmann, D. Gruenert, J. M. Tournier et P. Birembaut. 1998. «Association of fibroblastoid features with the invasive phenotype in human bronchial cancer cell lines». *Clin Exp Metastasis.* vol. 16, no 2, p. 105-112.
- Polette, M., B. Nawrocki, C. Gilles, H. Sato, M. Seiki, J. M. Tournier et P. Birembaut. 1996. «MT-MMP expression and localisation in human lung and breast cancers». *Virchows Arch.* vol. 428, no 1, p. 29-35.
- Prockop, D. J., et K. I. Kivirikko. 1995. «Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy». *Annu Rev Biochem.* vol. 64, p. 403-434.
- Puyraimond, A., R. Fridman, M. Lemesle, B. Arbeille et S. Menashi. 2001. «MMP-2 colocalizes with caveolae on the surface of endothelial cells». *Exp Cell Res.* vol. 262, no 1, p. 28-36.

- Ratnikov, B. I., D. V. Rozanov, T. I. Postnova, P. G. Baciú, H. Zhang, R. G. DiScipio, G. G. Chestukhina, J. W. Smith, E. I. Deryugina et A. Y. Strongin. 2002. «An alternative processing of integrin $\alpha(v)$ subunit in tumor cells by membrane type-1 matrix metalloproteinase». *J Biol Chem.* vol. 277, no 9, p. 7377-7385.
- Razani, B., S. E. Woodman et M. P. Lisanti. 2002. «Caveolae: from cell biology to animal physiology». *Pharmacol Rev.* vol. 54, no 3, p. 431-467.
- Regen, C. M., et A. F. Horwitz. 1992. «Dynamics of beta 1 integrin-mediated adhesive contacts in motile fibroblasts». *J Cell Biol.* vol. 119, no 5, p. 1347-1359.
- Remacle, A. G., D. V. Rozanov, P. C. Baciú, A. V. Chekanov, V. S. Golubkov et A. Y. Strongin. 2005. «The transmembrane domain is essential for the microtubular trafficking of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP)». *J Cell Sci.* vol. 118, no Pt 21, p. 4975-4984.
- Remacle, A., G. Murphy et C. Roghi. 2003. «Membrane type I-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) is internalised by two different pathways and is recycled to the cell surface». *J Cell Sci.* vol. 116, no Pt 19, p. 3905-3916.
- Ribatti, D., A. Vacca, B. Nico, G. De Falco, P. Giuseppe Montaldo et M. Ponzoni. 2002. «Angiogenesis and anti-angiogenesis in neuroblastoma». *Eur J Cancer.* vol. 38, no 6, p. 750-757.
- Robison, L. L., D. M. Green, M. Hudson, A. T. Meadows, A. C. Mertens, R. J. Packer, C. A. Sklar, L. C. Strong, Y. Yasui et L. K. Zeltzer. 2005. «Long-term outcomes of adult survivors of childhood cancer». *Cancer.* vol. 104, no 11 Suppl, p. 2557-2564.
- Rohatgi, R., L. Ma, H. Miki, M. Lopez, T. Kirchhausen, T. Takenawa et M. W. Kirschner. 1999. «The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly». *Cell.* vol. 97, no 2, p. 221-231.
- Rozanov, D. V., E. I. Deryugina, B. I. Ratnikov, E. Z. Monosov, G. N. Marchenko, J. P. Quigley et A. Y. Strongin. 2001. «Mutation analysis of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The role of the cytoplasmic tail Cys(574), the active site Glu(240), and furin cleavage motifs in oligomerization, processing, and self-proteolysis of MT1-MMP expressed in breast carcinoma cells». *J Biol Chem.* vol. 276, no 28, p. 25705-25714.
- Rozanov, D. V., et A. Y. Strongin. 2003. «Membrane type-1 matrix metalloproteinase functions as a proprotein self-convertase. Expression of the latent zymogen in *Pichia pastoris*, autolytic activation, and the peptide sequence of the cleavage forms». *J Biol Chem.* vol. 278, no 10, p. 8257-8260.
- Sabeh, F., I. Ota, K. Holmbeck, H. Birkedal-Hansen, P. Soloway, M. Balbin, C. Lopez-Otin, S. Shapiro, M. Inada, S. Krane, E. Allen, D. Chung et S. J. Weiss. 2004. «Tumor cell

traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP». *J Cell Biol.* vol. 167, no 4, p. 769-781. En ligne.
<http://www.jcb.org/cgi/content/full/167/4/769>.

Sahai, E. 2007. «Illuminating the metastatic process». *Nat Rev Cancer.* vol. 7, no 10, p. 737-749.

Sakakibara, M., S. Koizumi, Y. Saikawa, H. Wada, T. Ichihara, H. Sato, S. Horita, H. Mugishima, Y. Kaneko et K. Koike. 1999. «Membrane-type matrix metalloproteinase-1 expression and activation of gelatinase A as prognostic markers in advanced pediatric neuroblastoma». *Cancer.* vol. 85, no 1, p. 231-239.

Sanz-Moreno, V., G. Gadea, J. Ahn, H. Paterson, P. Marra, S. Pinner, E. Sahai et C. J. Marshall. 2008. «Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement». *Cell.* vol. 135, no 3, p. 510-523.

Sato, H., T. Kinoshita, T. Takino, K. Nakayama et M. Seiki. 1996. «Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2». *FEBS Lett.* vol. 393, no 1, p. 101-104.

Sato, H., T. Takino, Y. Okada, J. Cao, A. Shinagawa, E. Yamamoto et M. Seiki. 1994. «A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells». *Nature.* vol. 370, no 6484, p. 61-65.

Sato, T., M. del Carmen Ovejero, P. Hou, A. M. Heegaard, M. Kumegawa, N. T. Foged et J. M. Delaisse. 1997. «Identification of the membrane-type matrix metalloproteinase MT1-MMP in osteoclasts». *J Cell Sci.* vol. 110 (Pt 5), p. 589-596.

Scaltriti, M., et J. Baselga. 2006. «The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy». *Clin Cancer Res.* vol. 12, no 18, p. 5268-5272.

Schenk, S., E. Hintermann, M. Bilban, N. Koshikawa, C. Hojilla, R. Khokha et V. Quaranta. 2003. «Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution». *J Cell Biol.* vol. 161, no 1, p. 197-209.

Schilling, F. H., C. Spix, F. Berthold, R. Erttmann, N. Fehse, B. Hero, G. Klein, J. Sander, K. Schwarz, J. Treuner, U. Zorn et J. Michaelis. 2002. «Neuroblastoma screening at one year of age». *N Engl J Med.* vol. 346, no 14, p. 1047-1053.

Schwab, M., F. Westermann, B. Hero et F. Berthold. 2003. «Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology». *Lancet Oncol.* vol. 4, no 8, p. 472-480.

Seftor, R. E., E. A. Seftor et M. J. Hendrix. 1999. «Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion». *Cancer Metastasis Rev.* vol. 18, no 3, p. 359-375.

- Seiki, M. 2003. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion». *Cancer Lett.* vol. 194, no 1, p. 1-11.
- Seiki, M., et I. Yana. 2003. «Roles of pericellular proteolysis by membrane type-1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis». *Cancer Sci.* vol. 94, no 7, p. 569-574.
- Serini, G., L. Trusolino, E. Saggiorato, O. Cremona, M. De Rossi, A. Angeli, F. Orlandi et P. C. Marchisio. 1996. «Changes in integrin and E-cadherin expression in neoplastic versus normal thyroid tissue». *J Natl Cancer Inst.* vol. 88, no 7, p. 442-449.
- Shen, X. M., Y. P. Wu, Y. B. Feng, M. L. Luo, X. L. Du, Y. Zhang, Y. Cai, X. Xu, Y. L. Han, X. Zhang, Q. M. Zhan et M. R. Wang. 2007. «Interaction of MT1-MMP and laminin-5gamma2 chain correlates with metastasis and invasiveness in human esophageal squamous cell carcinoma». *Clin Exp Metastasis.* vol. 24, no 7, p. 541-550.
- Sheu, B. C., S. M. Hsu, H. N. Ho, H. C. Lien, S. C. Huang et R. H. Lin. 2001. «A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression». *Cancer Res.* vol. 61, no 1, p. 237-242.
- Shiratori, T., S. Miyatake, H. Ohno, C. Nakaseko, K. Isono, J. S. Bonifacino et T. Saito. 1997. «Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2». *Immunity.* vol. 6, no 5, p. 583-589.
- Smilenov, L. B., A. Mikhailov, R. J. Pelham, E. E. Marcantonio et G. G. Gundersen. 1999. «Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts». *Science.* vol. 286, no 5442, p. 1172-1174.
- Somerville, R. P., S. A. Oblander et S. S. Apte. 2003. «Matrix metalloproteinases: old dogs with new tricks». *Genome Biol.* vol. 4, no 6, p. 216.
- Sounni, N. E., L. Devy, A. Hajitou, F. Frankenne, C. Munaut, C. Gilles, C. Deroanne, E. W. Thompson, J. M. Foidart et A. Noel. 2002. «MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression». *Faseb J.* vol. 16, no 6, p. 555-564.
- Sounni, N. E., C. Roghi, V. Chabottaux, M. Janssen, C. Munaut, E. Maquoi, B. G. Galvez, C. Gilles, F. Frankenne, G. Murphy, J. M. Foidart et A. Noel. 2004. «Up-regulation of vascular endothelial growth factor-A by active membrane-type 1 matrix metalloproteinase through activation of Src-tyrosine kinases». *J Biol Chem.* vol. 279, no 14, p. 13564-13574.
- Sporn, M. B. 1996. «The war on cancer». *Lancet.* vol. 347, no 9012, p. 1377-1381.

- Stanton, H., J. Gavrilovic, S. J. Atkinson, M. P. d'Ortho, K. M. Yamada, L. Zardi et G. Murphy. 1998. «The activation of ProMMP-2 (gelatinase A) by HT1080 fibrosarcoma cells is promoted by culture on a fibronectin substrate and is concomitant with an increase in processing of MT1-MMP (MMP-14) to a 45 kDa form». *J Cell Sci.* vol. 111 (Pt 18), p. 2789-2798.
- Steinhusen, U., J. Weiske, V. Badock, R. Tauber, K. Bommert et O. Huber. 2001. «Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis». *J Biol Chem.* vol. 276, no 7, p. 4972-4980.
- Strongin, A. Y., I. Collier, G. Bannikov, B. L. Marmer, G. A. Grant et G. I. Goldberg. 1995. «Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease». *J Biol Chem.* vol. 270, no 10, p. 5331-5338.
- Sun, Y., J. M. Cheung, J. Martel-Pelletier, J. P. Pelletier, L. Wenger, R. D. Altman, D. S. Howell et H. S. Cheung. 2000. «Wild type and mutant p53 differentially regulate the gene expression of human collagenase-3 (hMMP-13)». *J Biol Chem.* vol. 275, no 15, p. 11327-11332.
- Sun, Y., Y. Sun, L. Wenger, J. L. Rutter, C. E. Brinckerhoff et H. S. Cheung. 1999. «p53 down-regulates human matrix metalloproteinase-1 (Collagenase-1) gene expression». *J Biol Chem.* vol. 274, no 17, p. 11535-11540.
- Symons, M., et J. E. Segall. 2009. «Rac and Rho driving tumor invasion: who's at the wheel?». *Genome Biol.* vol. 10, no 3, p. 213.
- Szabova, L., K. Chrysovergis, S. S. Yamada et K. Holmbeck. 2008. «MT1-MMP is required for efficient tumor dissemination in experimental metastatic disease». *Oncogene.* vol. 27, no 23, p. 3274-3281.
- Takahashi, C., Z. Sheng, T. P. Horan, H. Kitayama, M. Maki, K. Hitomi, Y. Kitaura, S. Takai, R. M. Sasahara, A. Horimoto, Y. Ikawa, B. J. Ratzkin, T. Arakawa et M. Noda. 1998. «Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 95, no 22, p. 13221-13226.
- Takahashi, M., T. Tsunoda, M. Seiki, Y. Nakamura et Y. Furukawa. 2002. «Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the beta-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers». *Oncogene.* vol. 21, no 38, p. 5861-5867.
- Takino, T., N. Koshikawa, H. Miyamori, M. Tanaka, T. Sasaki, Y. Okada, M. Seiki et H. Sato. 2003. «Cleavage of metastasis suppressor gene product KiSS-1 protein/metastin by matrix metalloproteinases». *Oncogene.* vol. 22, no 30, p. 4617-4626.

- Takino, T., H. Miyamori, Y. Watanabe, K. Yoshioka, M. Seiki et H. Sato. 2004. «Membrane type 1 matrix metalloproteinase regulates collagen-dependent mitogen-activated protein/extracellular signal-related kinase activation and cell migration». *Cancer Res.* vol. 64, no 3, p. 1044-1049.
- Tam, E. M., C. J. Morrison, Y. I. Wu, M. S. Stack et C. M. Overall. 2004. «Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 101, no 18, p. 6917-6922.
- Tennenbaum, T., A. K. Weiner, A. J. Belanger, A. B. Glick, H. Hennings et S. H. Yuspa. 1993. «The suprabasal expression of alpha 6 beta 4 integrin is associated with a high risk for malignant progression in mouse skin carcinogenesis». *Cancer Res.* vol. 53, no 20, p. 4803-4810.
- Tester, A. M., N. Ruangpanit, R. L. Anderson et E. W. Thompson. 2000. «MMP-9 secretion and MMP-2 activation distinguish invasive and metastatic sublines of a mouse mammary carcinoma system showing epithelial-mesenchymal transition traits». *Clin Exp Metastasis.* vol. 18, no 7, p. 553-560.
- Tokuraku, M., H. Sato, S. Murakami, Y. Okada, Y. Watanabe et M. Seiki. 1995. «Activation of the precursor of gelatinase A/72 kDa type IV collagenase/MMP-2 in lung carcinomas correlates with the expression of membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) and with lymph node metastasis». *Int J Cancer.* vol. 64, no 5, p. 355-359.
- Tonini, T., F. Rossi et P. P. Claudio. 2003. «Molecular basis of angiogenesis and cancer». *Oncogene.* vol. 22, no 42, p. 6549-6556.
- Tonnesen, M. G., X. Feng et R. A. Clark. 2000. «Angiogenesis in wound healing». *J Invest Dermatol Symp Proc.* vol. 5, no 1, p. 40-46.
- Tortora, Gerard J, et Sandra R Grabowski. 2002. *Principes d'anatomie et de physiologie*, 3ème édition: De Boeck Université.
- Toth, M., S. Hernandez-Barrantes, P. Osenkowski, M. M. Bernardo, D. C. Gervasi, Y. Shimura, O. Meroueh, L. P. Kotra, B. G. Galvez, A. G. Arroyo, S. Mobashery et R. Fridman. 2002. «Complex pattern of membrane type 1 matrix metalloproteinase shedding. Regulation by autocatalytic cells surface inactivation of active enzyme». *J Biol Chem.* vol. 277, no 29, p. 26340-26350.
- Tsunezuka, Y., H. Kinoh, T. Takino, Y. Watanabe, Y. Okada, A. Shinagawa, H. Sato et M. Seiki. 1996. «Expression of membrane-type matrix metalloproteinase 1 (MT1-MMP) in tumor cells enhances pulmonary metastasis in an experimental metastasis assay». *Cancer Res.* vol. 56, no 24, p. 5678-5683.

- Tu, G., W. Xu, H. Huang et S. Li. 2008. «Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors». *Curr Med Chem*. vol. 15, no 14, p. 1388-1395.
- Tyagi, S. C., K. Lewis, D. Pikes, A. Marcello, V. S. Mujumdar, L. M. Smiley et C. K. Moore. 1998. «Stretch-induced membrane type matrix metalloproteinase and tissue plasminogen activator in cardiac fibroblast cells». *J Cell Physiol*. vol. 176, no 2, p. 374-382.
- Udayakumar, T. S., M. L. Chen, E. L. Bair, D. C. Von Bredow, A. E. Cress, R. B. Nagle et G. T. Bowden. 2003. «Membrane type-1-matrix metalloproteinase expressed by prostate carcinoma cells cleaves human laminin-5 beta3 chain and induces cell migration». *Cancer Res*. vol. 63, no 9, p. 2292-2299.
- Uekita, T., I. Gotoh, T. Kinoshita, Y. Itoh, H. Sato, T. Shiomi, Y. Okada et M. Seiki. 2004. «Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail-binding protein-1 is a new member of the Cupin superfamily. A possible multifunctional protein acting as an invasion suppressor down-regulated in tumors». *J Biol Chem*. vol. 279, no 13, p. 12734-12743.
- Uekita, T., Y. Itoh, I. Yana, H. Ohno et M. Seiki. 2001. «Cytoplasmic tail-dependent internalization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase is important for its invasion-promoting activity». *J Cell Biol*. vol. 155, no 7, p. 1345-1356.
- Ueno, H., H. Nakamura, M. Inoue, K. Imai, M. Noguchi, H. Sato, M. Seiki et Y. Okada. 1997. «Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas». *Cancer Res*. vol. 57, no 10, p. 2055-2060.
- van Hinsbergh, V. W., M. A. Engelse et P. H. Quax. 2006. «Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. vol. 26, no 4, p. 716-728.
- Verkhovsky, A. B., T. M. Svitkina et G. G. Borisy. 1995. «Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles». *J Cell Biol*. vol. 131, no 4, p. 989-1002.
- Visse, R., et H. Nagase. 2003. «Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry». *Circ Res*. vol. 92, no 8, p. 827-839.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers et F. van Roy. 1991. «Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role». *Cell*. vol. 66, no 1, p. 107-119.

- Wang, X., D. Ma, J. Keski-Oja et D. Pei. 2004. «Co-recycling of MT1-MMP and MT3-MMP through the trans-Golgi network. Identification of DKV582 as a recycling signal». *J Biol Chem.* vol. 279, no 10, p. 9331-9336.
- Will, H., S. J. Atkinson, G. S. Butler, B. Smith et G. Murphy. 1996. «The soluble catalytic domain of membrane type 1 matrix metalloproteinase cleaves the propeptide of progelatinase A and initiates autoproteolytic activation. Regulation by TIMP-2 and TIMP-3». *J Biol Chem.* vol. 271, no 29, p. 17119-17123.
- Wolf, K., I. Mazo, H. Leung, K. Engelke, U. H. von Andrian, E. I. Deryugina, A. Y. Strongin, E. B. Brocker et P. Friedl. 2003. «Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis». *J Cell Biol.* vol. 160, no 2, p. 267-277.
- Woods, W. G., R. N. Gao, J. J. Shuster, L. L. Robison, M. Bernstein, S. Weitzman, G. Bunin, I. Levy, J. Brossard, G. Dougherty, M. Tuchman et B. Lemieux. 2002. «Screening of infants and mortality due to neuroblastoma». *N Engl J Med.* vol. 346, no 14, p. 1041-1046.
- Wu, J., Q. N. Ma et K. S. Lam. 1994. «Identifying substrate motifs of protein kinases by a random library approach». *Biochemistry.* vol. 33, no 49, p. 14825-14833.
- Wu, X., B. Gan, Y. Yoo et J. L. Guan. 2005. «FAK-mediated src phosphorylation of endophilin A2 inhibits endocytosis of MT1-MMP and promotes ECM degradation». *Dev Cell.* vol. 9, no 2, p. 185-196.
- Yamamoto, M., S. Mohanam, R. Sawaya, G. N. Fuller, M. Seiki, H. Sato, Z. L. Gokaslan, L. A. Liotta, G. L. Nicolson et J. S. Rao. 1996. «Differential expression of membrane-type matrix metalloproteinase and its correlation with gelatinase A activation in human malignant brain tumors in vivo and in vitro». *Cancer Res.* vol. 56, no 2, p. 384-392.
- Yana, I., et S. J. Weiss. 2000. «Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases». *Mol Biol Cell.* vol. 11, no 7, p. 2387-2401.
- Yilmaz, M., G. Christofori et F. Lehenbre. 2007. «Distinct mechanisms of tumor invasion and metastasis». *Trends Mol Med.* vol. 13, no 12, p. 535-541.
- Yoshizaki, T., H. Sato, Y. Maruyama, S. Muro, M. Furukawa, C. S. Park et M. Seiki. 1997. «Increased expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase in head and neck carcinoma». *Cancer.* vol. 79, no 1, p. 139-144.
- Yu, M., H. Sato, M. Seiki et E. W. Thompson. 1995. «Complex regulation of membrane-type matrix metalloproteinase expression and matrix metalloproteinase-2 activation by concanavalin A in MDA-MB-231 human breast cancer cells». *Cancer Res.* vol. 55, no 15, p. 3272-3277.

- Zhai, Y., K. B. Hotary, B. Nan, F. X. Bosch, N. Munoz, S. J. Weiss et K. R. Cho. 2005.
«Expression of membrane type 1 matrix metalloproteinase is associated with cervical carcinoma progression and invasion». *Cancer Res.* vol. 65, no 15, p. 6543-6550.
- Zhou, Z., S. S. Apte, R. Soininen, R. Cao, G. Y. Baaklini, R. W. Rauser, J. Wang, Y. Cao et K. Tryggvason. 2000. «Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 97, no 8, p. 4052-4057.